DIE HPLC-ANALYSE VON CUCURBITACINHALTIGEN ARZNEIDROGEN UND PHORBOLESTERN

RUDOLF BAUER

Diss München
1984

[illegible]

Die HPLC-Analyse von cucurbitacinhaltigen Arzneidrogen und Phorbolestern

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Rudolf Bauer

aus

Buchbach / Obb.

Januar 1984

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. E. R e i m a n n

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Februar 1984

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534901_0035

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

E I N L E I T U N G 1

A L L G E M E I N E R T E I L 2

Kapitel 1:

Standardisierung cucurbitacinhaltiger Arzneidrogen . 2

I. Chemie, Vorkommen, Pharmakologie und bisheriger Stand der Analytik cucurbitacinhaltiger Arzneidrogen 2

1. Chemie der Cucurbitacine 2

2. Verbreitung der Cucurbitacine 4

3. Pharmakologie und Anwendung cucurbitacinhaltiger Drogen 6

4. Bisherige Analytik der Cucurbitacine 9

II. Die HPLC-Methode 12

1. Dünnschichtchromatographie 12

2. Hochleistungsflüssigchromatographie 19

2.1. Probenvorbereitung 19

2.2. Das HPLC-System 23

2.3. Analytische HPLC von cucurbitacinhaltigen Drogenextrakten 28

2.3.1. Peakidentifizierung 28

2.3.1.1. Vergleich mit Referenzsubstanzen 29

2.3.1.2. On-line Aufnahme der UV-Spektren 29

2.3.1.3. Off-line Aufnahme der Massenspektren . . 32

2.3.2. Beschreibung der Chromatogramme 32

2.3.2.1. Colocynthidis fructus 32

2.3.2.2. Gratiolae herba 35

2.3.2.3. Luffae fructus 38

2.3.2.4. Iberidis semen 39

2.3.2.5. Ecballii fructus 41

2.3.2.6. Tayuyae radix 43

2.3.2.7. Bryoniae radix 44

2.4. Analytische HPLC von cucurbitacinhaltigen Phytopräparaten 48

2.4.1. Colocynthis Homaccord^{R} 48

Seite

2.4.2. Pilfor^{R}-Dragees 48
2.4.3. Rheogen^{R}-Dragees 51
2.5. Versuche zur Optimierung der HPLC-Trennung der Cucurbitacine 52
2.6. Präparative HPLC von Extr. Colocynthidis . . 54
2.7. Quantitative Bestimmung der Cucurbitacine durch HPLC dargestellt am Beispiel Luffae fructus 57
2.8. Untersuchung verschiedener Chargen von Bryoniae radix und Vergleich von Bryonia alba und B.dioica 63
3. Diskussion der in Kapitel 1 erhaltenen Ergebnisse 68

Kapitel 2:

Isolierung der Inhaltsstoffe von Cayaponia tayuya . . 71
I. Vorkommen und botanische Beschreibung von Cayaponia tayuya 71
1. Systematik und Verbreitung 71
2. Botanische Beschreibung der Pflanze 71
II. Verwendung in der Volksmedizin 75
III. Bisher bekannte Inhaltsstoffe 76
IV. Isolierung der Cucurbitacine aus der Wurzel von Cayaponia tayuya (VELL.)COGN. 77
1. Extraktion der Droge 77
2. Voruntersuchungen 77
2.1. Dünnschichtchromatographie 77
2.2. Hochleistungsflüssigchromatographie 79
2.3. UV-Spektren 82
2.4. Hydrolyseversuche 85
3. Isolierung der Cucurbitacine mittels HPLC . . . 88
4. Identifizierung der isolierten Verbindungen . . 91
4.1. Substanz C.t. I 91
4.2. Identifizierung von C.t. IV (= Glykosid 1) und C.t. V (= Aglykon 1) 91

Seite

4.3. Identifizierung von C.t. VI (Glykosid 2) und C.t. X (Aglykon 2) 98
4.4. Identifizierung von C.t. XII 102
5. Identifizierung von Cucurbitacin B und Cucurbitacin B-glucosid 104

V. Isolierung und Identifizierung der Flavonoide aus der Wurzel von Cayaponia tayuya (VELL.)COGN. . . . 105
1. Extraktion und Analytik der Flavonoide 105
2. Isolierung und Identifizierung der Flavonoide . 108
3. Chromatographische Identifizierung weiterer Flavonoide 110

VI. Pharmakologische Untersuchungen 112

VII. Diskussion der in Kapitel 2 erhaltenen Ergebnisse 113

Kapitel 3:

Die HPLC von Diterpenestern aus Euphorbiaceen 115
I. Chemie der Phorbolester 115

II. Verbreitung der Phorbolester 117

III. Pharmakologische Bedeutung der Phorbolester und verwandter Diterpenester 118

IV. Bisherige Analysen- und Isolierungsverfahren für Phorbolester und andere Diterpenester 120

V. Die HPLC-Methode 122
1. Analyse der Phorbolester im Crotonöl 122
1.1. Dünnschichtchromatographie 124
1.2. Analytische HPLC von Crotonharz 125
1.3. Präparative HPLC der Phorbolester 129
1.4. Semipräparative HPLC der Phorbolester 131
1.5. Identifizierung der isolierten Verbindungen . 132
1.5.1. Gaschromatographische Bestimmung der Säuren 132
1.5.2. Massenspektrometrie der Phorbolester . . . 135
2. HPLC-Trennung von Croton tiglium Urtinktur . . 142
3. HPLC-Analyse von Diterpenestern in verschiedenen Pflanzenextrakten 143

Seite

3.1. Extraktbereitung 143
3.2. HPLC-Trennung der Extrakte 145

VI. Diskussion der in Kapitel 3 erhaltenen Ergebnisse 151

Z U S A M M E N F A S S U N G 153

E X P E R I M E N T E L L E R T E I L 156

Kapitel 1:

I. Herkunft der Drogen 156

II. Herkunft der Vergleichssubstanzen 157

III. Katalytische Hydrierung der Cucurbitacine B, E u. I 158

IV. Herstellung der Analysenlösungen aus cucurbitacinhaltigen Drogen 158
1. Allgemeiner Extraktionsgang 158
2. Anreicherungsmethode 159
3. Verschiedene Extraktionsarten für Bryoniae rad. 160
4. Extraktion von Cucurbitacinen aus Phytopräparaten 161
4.1. Urtinkturen nach dem Homöopathischen Arzneibuch (HAB) 161
4.2. Colocynthis-Homaccord^{R} 161
4.2.1. Ausschüttelung mit Chloroform 161
4.2.2. Einengen der Lösung 161
4.3. Pilfor^{R}-Dragees 161
4.4. Rheogen^{R}-Dragees 162
5. Dünnschichtchromatographie 162
5.1. Adsorbentien 162
5.2. Laufmittel für Cucurbitacine 162
5.3. Detektion 162
5.4. Auftrageweise 163
6. Hochleistungsflüssigchromatographie 163
6.1. Technische Daten 163
6.2. Trennsysteme 164
6.3. Lösungsmittel 166
6.4. Zubereitung der Probenlösungen 166

Seite

7. Isolierung der Cucurbitacinglykoside aus Colocynthidis fructus mit HPLC 166
7.1. Anreicherung der Cucurbitacine 166
7.2. Semipräparative Isolierung mit HPLC 167
8. Quantitative Bestimmung der Cucurbitacine in Luffae fructus durch HPLC 167
8.1. Herstellung der Analysenlösungen 167
8.2. Herstellung der Eichlösung 168
8.3. Kalibrierung 168
8.4. Quantitative Bestimmung 169
9. Vergleich verschiedener Bryoniae radix-Chargen 170
9.1. Herstellung der Analysenlösungen 170
9.2. Herstellung der Eichlösung 170
9.3. Kalibrierung 171
9.4. Quantitative Bestimmung 171

Kapitel 2:

I. Herkunft der Droge 172

II. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen 172

III. Allgemeine Arbeitsmethoden 172
1. Dünnschichtchromatographie 172
2. Hochleistungsflüssigchromatographie 173
2.1. Technische Daten 173
2.2. Trennsysteme 173
2.2.1. Analytische HPLC 173
2.2.2. Präparative HPLC 173
3. Offene Säulenchromatographie 175

IV. Physikalisch-chemische Untersuchungen 175
1. Schmelzpunkte 175
2. UV-Spektren 175
3. IR-Spektren 175
4. Massenspektren 175
4.1. EI-MS 175
4.2. DCI-MS 176
4.3. FAB-MS 176
5. ^{1}H-NMR-Spektren 176
6. ^{13}C-NMR-Spektren 176

Seite

V. Pharmakologische Untersuchungen 177
1. Screening auf Antitumorwirksamkeit am National Cancer Institut, Bethesda, Maryland, USA . . . 177
2. Bestimmung des Phagozytose-Index 177

VI. Spezielle Arbeitsmethoden 177
1. Isolierung der Cucurbitacine mittels HPLC . . . 177
1.1. Extraktion 177
1.2. Vorfraktionierung des Chloroformextraktes mit präparativer HPLC 177
1.3. Semipräparative Auftrennung der Fraktionen . 178
2. Isolierung der Flavonoide 179
2.1. Extraktion 179
2.2. Fraktionierte Kristallisation von Swertisin und Spinosin 179
2.3. Säulenchromatographische Isolierung der übrigen Flavonoide 179
3. Hydrolysen 180
3.1. Schwefelsäure-Hydrolyse 180
3.2. Trifluoressigsäure-Hydrolyse 180
3.3. Enzymatische Hydrolysen 181

VII. Identifizierung der isolierten Verbindungen . . . 181
1. Swertisin 181
2. Spinosin 182
3. Vicenin 2 183
4. Vitexin 184
5. Isovitexin 184
6. Orientin 185
7. Isoorientin 185
8. Cucurbitacin R-2-O-glucosid 186
9. Cucurbitacin R 186
10. 23,24-Dihydrocucurbitacin B-2-O-glucosid . . . 187
11. 23,24-Dihydrocucurbitacin B 187
12. 23,24-Dihydroisocucurbitacin B 188

VIII. Herkunft der Vergleichssubstanzen 188
1. Cucurbitacine 188
2. Flavonoide 188

Seite

Kapitel 3:

I. Herkunft der Drogen 189

II. Herkunft der Vergleichssubstanzen 189

III. Allgemeine Arbeitsmethoden 189

1. Dünnschichtchromatographie 189

1.1. Adsorbentien für die analytische DC 189

1.2. Adsorbentien für die präparative DC 189

1.3. Auftrageweise bei der analytischen DC 189

1.4. Laufmittel für Diterpenester 190

1.5. Detektion 190

2. Hochleistungsflüssigchromatographie 190

2.1. Technische Daten 190

2.2. Trennsysteme 191

2.2.1. Analytische HPLC 191

2.2.2. Präparative HPLC 191

2.3. Lösungsmittel 193

2.4. Zubereitung der Probenlösungen 193

3. Gaschromatographie 193

3.1. Technische Daten 193

3.2. Trennsysteme 193

4. Massenspektrometrie 194

IV. Spezielle Arbeitsmethoden 194

1. Isolierung der Phorbolester aus Crotonöl . . . 194

1.1. Gewinnung von Crotonharz 194

1.2. Fraktionierung von Crotonharz mit präparativer HPLC 194

1.3. Reinigung der Fraktionen mit semipräparativer HPLC 194

1.4. Gewinnung von Cr IX 195

2. Herstellung der Fettsäuremethylester 195

3. Herstellung diterpenesterhaltiger Pflanzenextrakte 196

3.1. Extraktion des Latex von Euphorbia canariensis 196

3.2. Extraktion von Euphorbia cyparissias 196

3.3. Extraktion von Mezerei cortex 197

Seite

V. Ergebnisse bei der Identifizierung der Phorbolester aus Crotonöl 197
1. Bestimmung der Fettsäuren mit GC 197
2. Massenspektren 197

A N H A N G 199

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S 200

E I N L E I T U N G

Eine Reihe cucurbitacin- und phorbolesterhaltiger Drogenextrakte sind Bestandteile allopathischer und homöopathischer Arzneipräparate.

In der Therapie finden sie bevorzugt wegen ihrer antirheumatischen sowie antiarthritischen Wirkung Anwendung. Möglicherweise beruht diese auf einer unspezifischen Beeinflussung zellulärer Immunabwehrmechanismen. Da Phorbolester und Cucurbitacine bei hoher Dosierung phlogistische und irritierende Eigenschaften besitzen, scheint der therapeutische Effekt, wenn entsprechend niedrig dosiert wird, über einen sog. "counter irritant-Mechanismus" zustande zu kommen.

Die Aufklärung dieses Mechanismus und eine rationale Therapie setzen aber brauchbare Verfahren voraus, mit denen der qualitative Nachweis und die quantitative Bestimmung dieser Verbindungen auch in niedriger Konzentration in Drogenzubereitungen möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher versucht werden, mit Hilfe der HPLC neue Bestimmungsmethoden auszuarbeiten, die zur Standardisierung von Drogen und Arzneipräparaten geeignet sind. Gleichzeitig sollte damit die Grundlage für neue pharmakologische Untersuchungen und klinische Studien geschaffen werden.

A L L G E M E I N E R T E I L

Kapitel 1:

Standardisierung cucurbitacinhaltiger Arzneidrogen

I. Chemie, Vorkommen, Pharmakologie und bisheriger Stand der Analytik cucurbitacinhaltiger Arzneidrogen

1. Chemie der Cucurbitacine

Bei den Cucurbitacinen handelt es sich um sauerstoffreiche, tetrazyklische Triterpene, die nicht wie üblich in C-10-Stellung, sondern in C-9-Stellung eine Methylgruppe tragen. Das den meisten Cucurbitacinen gemeinsame Kohlenstoffskelett (siehe Abb. 1) hat die Struktur 19(10⟶9β)-abeo-10α-Lanost-5-en(=10α-Cucurbit-5-en) (1).

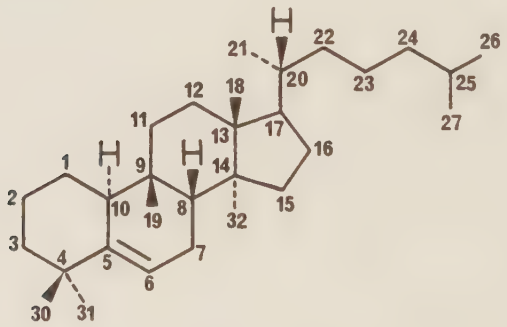
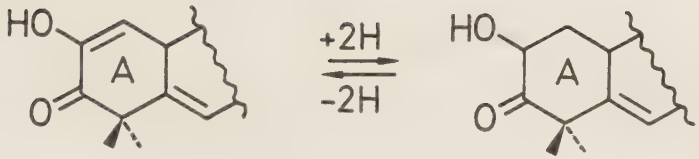


Abb. 1

Kohlenstoffskelett der Cucurbitacine

Nach der Substitution des A-Ringes unterscheidet man zwischen Diosphenol- und α-Ketol-Cucurbitacinen (siehe Abb. 2, S. 3).



Diosphenol
(z.B. Cucurbitacin I)

α-Ketol
(z.B. Cucurbitacin D)

Abb. 2

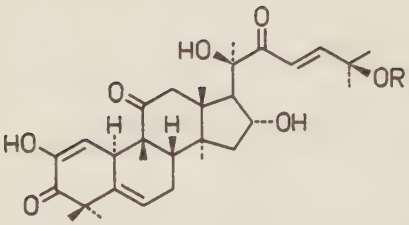
Die fast allen Cucurbitacinen gemeinsame C8-Seitenkette am C-17 trägt meistens am C-22 eine Oxo- und am C-25 eine Hydroxylgruppe. Die Seitenkette kann gesättigt sein oder eine 23,24-Doppelbindung enthalten. Weitere Sauerstoffunktionen finden sich bei den Cucurbitacinen zumeist am C-16, C-20 und C-11.

Insgesamt kennt man bis heute über 40 verschiedene Substitutionstypen. Sie wurden ursprünglich mit fortlaufendem Alphabet bezeichnet. Einige wichtige Vertreter dieser Stoffklasse sind in Abb. 3, S. 4, wiedergegeben.

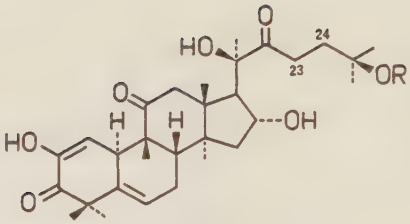
Cucurbitacine kommen in der Pflanze sowohl in freier als auch in glykosidierter Form vor (2-O- oder 16-O-Glykoside), wobei die 2-O-Monoglucoside überwiegen.

Biosynthetisch leiten sie sich von Squalen-2,3-epoxid ab, das als Ausgangsstoff der Sterolbiosynthese gilt. BALLIANO und Mitarb. (2) konnten kürzlich zeigen, daß Cucurbitacine aus Squalenepoxid durch direkte enzymatische Zyklisierung, ohne Durchlaufen des Lanostantyps als Zwischenstufe, entstehen. Somit handelt es sich vermutlich um einen zu den Sterolen parallel verlaufenden Biosyntheseweg.

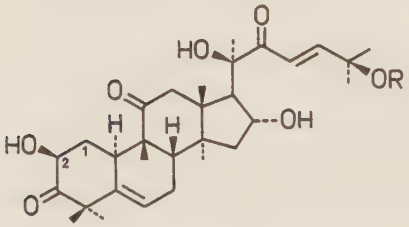
Eine zusammenfassende Darstellung der Chemie der Cucurbitacine gibt Literatur (1).



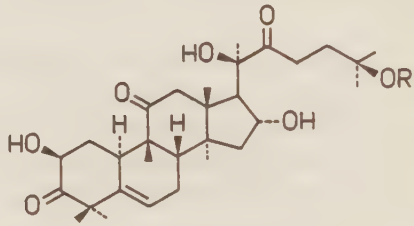
R = H Cucurbitacin I
R = Ac Cucurbitacin E



R = H Cucurbitacin L
R = Ac 23,24-Dihydrocucurbitacin E



R = H Cucurbitacin D
R = Ac Cucurbitacin B



R = H Cucurbitacin R
R = Ac 23,24-Dihydrocucurbitacin B

Abb. 3

Die Formeln der wichtigsten Cucurbitacine

2. Verbreitung der Cucurbitacine

Während man früher annahm, daß Cucurbitacine ausschließlich in der Cucurbitaceen-Familie vorkommen (3), sind in der Folgezeit in zahlreichen anderen Pflanzenfamilien entsprechende Verbindungen aufgefunden worden (vgl. Tab. 1, S. 5).

Die Annahme, Cucurbitacine seien ein taxonomisches Merkmal der Cucurbitaceae ist somit überholt. Vielmehr muß ein ubiquitäres Vorkommen angenommen werden, da die verschiedenen cucurbitacinhaltigen Gattungen kaum miteinander in Beziehung stehen.

Tabelle 1: Pflanzenfamilien und -gattungen, in denen bisher Cucurbitacine nachgewiesen wurden

Familie	Gattung
Cucurbitaceae	Acanthosicyos, Benincasa, Brandegea, Bryonia, Citrullus, Coccinia, Corallocarpus, Cucumis, Cucurbita, Datisca, Ecballium, Echinocystis, Gerrardanthus, Kedrostis, Lagenaria, Luffa, Marah, Melothria, Momordica, Peponium, Sicyos, Telfairia, Trochomeria
Brassicaceae	Iberis, Lepidium
Begoniaceae	Begonia
Elaeocarpaceae	Crinodendron
Euphorbiaceae	Trewia
Lauraceae	Litsea
Liliaceae	Phormium
Primulaceae	Anagallis
Scrophulariaceae	Gratiola
Rosaceae	Purshia

Innerhalb einer Pflanze kann ihr Vorkommen auf einzelne Organteile beschränkt sein. Insgesamt wurden sie aber schon in praktisch allen Pflanzenteilen (Wurzel, Stengel, Blätter, Früchte, Samen) gefunden (2).

Detaillierte Angaben über die Verbreitung der Cucurbitacine im Pflanzenreich gibt die Literatur (1).

3. Pharmakologie und Anwendung cucurbitacinhaltiger Drogen

Cucurbitacinhaltige Drogen werden seit dem Altertum als Abführmittel (Drastika) und Diuretika verwendet (4). Erste Hinweise finden sich bereits im Papyrus Ebers und im Alten Testament (vgl.5).

Außerdem wird ihnen eine Wirkung bei rheumatischen und allergischen Erkrankungen zugeschrieben. Auch bei der Behandlung der Gicht spielen sie eine Rolle.

Die aus Südamerika stammende Droge Cayaponia tayuya (=Trianosperma tayuya) wird als Purgans, Diuretikum und Depurativum, sowie zusätzlich bei Gicht, Arthritis und Ischias angewendet (6).

In der Homöopathie werden vor allem Tinkturen von Bryonia cretica, Luffa operculata und Citrullus colocynthis zur Behandlung von fieberhaften und rheumatischen Erkrankungen, (Heu-)schnupfen und Darmkatarrh eingesetzt (7).

Tabelle 2, S. 7, gibt eine Zusammenstellung der wichtigsten Anwendungsgebiete von cucurbitacinhaltigen Drogen nach HOPPE (8) und HAGER (9).

Da die Cucurbitacine stark bitteren Geschmack besitzen, wurde man schon sehr früh auf sie aufmerksam. Bereits 1831 wurde Elaterin (Cucurbitacin E) in kristallinem Zustand aus Ecballium elaterium isoliert, allerdings konnte die Struktur noch nicht geklärt werden (vgl.10). Heute zählt man die Cucurbitacine nicht mehr zu den klassischen Bitterstoffen, da sie andere hervorstechende pharmakologische Wirkungen besitzen.

Neben der laxierenden Wirkung (11,12) ist vor allem die tumorinhibierende Wirkung von Bedeutung. Sie wurde zunächst für die Cucurbitacine D, E und I beschrieben (13,14). In der Folgezeit erkannte man noch eine Reihe weiterer Cucurbitacine als cancerostatisch wirksam (Literaturzusammenfassung bei (1), (15), (16) und (17)).

Tabelle 2: Anwendung cucurbitacinhaltiger Drogen nach HOPPE (8) und HAGER (9)

Droge	Allopathie	Homöopathie
Bryoniae radix	als Laxans und Diuretikum; bei Polyarthritis rheumatica	bei akuten fieberhaften, katarrhalischen und rheumatischen Erkrankungen; bei Brustfell- und Lungenentzündung; zur Beseitigung von Schmerzempfindungen
Tayuyae radix	als Purgans; bei Rheuma und Arthritis	
Colocynthidis fructus	als Drastikum	gegen Krämpfe der glatten Muskulatur; bei Neuralgien und Neuritiden, Darmkatarrhen, Nierenaffektionen mit Harnblasenbeschwerden und Dysmenorrhoe
Ecballii fructus	als Drastikum	bei Diarrhoen und Koliken
Gratiolae herba	als Drastikum und Anthelminthikum; bei Gicht, Leberleiden, chronischen Hautleiden; als Diuretikum und Purgans	bei Gastroenteritis, Nieren- und Blasenkatarrh, Nymphomanie und Melancholie
Iberidis semen	zur Anregung der Magensaftsekretion; als Amarum mit choleretischem Effekt	bei Herzmuskelschwäche, Koronarinsuffizienz, Stenokardie, Herzarrhythmie; bei Verdauungsstörungen
Luffae fructus	als Purgans, Diuretikum und Cancerostatikum	gegen Erkrankungen der oberen Luftwege, der Nasennebenhöhlen und gegen Schnupfen

Möglicherweise steht ihr Wirkungsmechanismus mit einem Eingriff in die anaerobe Glykolyse in Zusammenhang (13). WHITEHOUSE und DOSKOTCH (18) konnten für die Cucurbitacine B und D, sowie für 23,24-Dihydrocucurbitacin B in vitro eine Hemmung des Thymidineinbaues in Lymphozyten-DNA feststellen, wobei im Falle von 23,24-Dihydrocucurbitacin B nachgewiesen wurde, daß die Hemmung nicht über die Bindung an Thiolgruppen erfolgt.

Obwohl die in vitro gemessene Zytotoxizität mancher Cucurbitacine die Werte von Substanzen wie Actinomycin D erreicht, konnten sie bisher therapeutisch nicht eingesetzt werden, da sie eine zu hohe Toxizität aufweisen (17,19).

Für einzelne Cucurbitacine wird eine Leberschutzwirkung (20), antifertile Wirkung (21) und anthelminthische Aktivität (22) beschrieben.

Das einzige Cucurbitacin, das bisher eingehend pharmakologisch untersucht wurde, ist Cucurbitacin D. EDERY und Mitarb. (23) fanden, daß es beim Hund negativ inotrop und negativ chronotrop wirkt und zu einer starken Blutdrucksenkung führt. Des weiteren wurde eine deutliche Erhöhung der Kapillarpermeabilität beobachtet.

MÜLLER und WICHTL (24) konnten für die in Gratiola officinalis enthaltenen Cucurbitacinglykoside (u.a. Cucurbitacin E- und I-glucosid) ebenfalls eine Herzwirkung nachweisen und damit die immer wieder beschriebene Herzwirksamkeit von Gottesgnadenkraut klären.

Die Bedeutung der Cucurbitacine für die Pflanze ist noch recht unklar. Während NIELSEN und Mitarb. (25) von Fraßschutzstoffwirkung berichten, fanden andere Autoren (3,26,27), daß ihnen für bestimmte Käferarten insekten-anlockende Eigenschaften zukommen. Daneben wurde auch eine Antigibberelinwirkung beschrieben (28).

Gelegentlich enthalten einige kultivierte Gemüsearten, wie z.B. Gurken, Kürbisse und Melonen, Cucurbitacine, die dann einen bitteren Geschmack verursachen (29). In Südafrika sind in solchen Fällen sogar Vergiftungen beim Genuß von Kürbissen und Wassermelonen beschrieben worden (30).

4. Bisherige Analytik der Cucurbitacine

Cucurbitacinhaltige Extrakte wurden zunächst papierchromatographisch (31), später aber fast ausschließlich dünnschichtchromatographisch (32-36) analysiert. Kürzlich wurde auch über eine gaschromatographische Trennung von α-Ketolcucurbitacinen nach Derivatisierung (Methoxim-Trimethylsilylierung) berichtet (37).

Zur quantitativen Bestimmung fanden verschiedene spektrophotometrische und chromatographische Verfahren Anwendung:

Für die Cucurbitacine E und B in Citrullus colocynthis und Luffa echinata beschrieben MURTY und Mitarb. (38) eine spektrophotometrische Methode, mit der die Cucurbitacine nach papierchromatographischer Auftrennung des alkoholischen Extraktes und Elution bei 230 nm bestimmt werden. Die Absorption unterliegt dem Beer'schen Gesetz im Konzentrationsbereich von 5 - 60 µg/ml bzw. 5 - 70 µg/ml.

SHARMA und HALL (39) publizierten eine DC-photometrische Methode zur Bestimmung von Cucurbitacin B in Cucurbita pepo, wobei die entsprechende Zone eluiert und bei 229 nm gemessen wird. Die gleiche Methode verwendeten kürzlich auch METCALF und Mitarb. (40) zur Bestimmung der Cucurbitacine E, B, D und I, sowie Cucurbitacin E-glucosid in verschiedenen Organen von 18 Cucurbita-Arten.

DARWISH-SAYED und Mitarb. (41) benutzten ebenfalls eine kombinierte DC-photometrische Methode zur Bestimmung von Cucurbitacin E-glucosid im Ethanolextrakt von Colocynthidis fructus: Nach DC-Trennung (Chloroform-Methanol 9:1) und Elution

der entsprechenden Zone wird mit Natriummethylat versetzt und die entstehende Färbung bei 420 nm photometrisch gemessen.

BALBAA und Mitarb. (42) beschrieben eine Gesamtbestimmung der Cucurbitacine in verschiedenen Organen von Ecballium elaterium, wobei sie einen angereicherten Extrakt mit Triphenyltetrazoliumchlorid versetzen und die entstehende Färbung bei 485 nm messen. Als Bezugssubstanz dient Cucurbitacin E.

KANNAIYAN und PURUSHOTHAMAN (43) veröffentlichten eine DC-photometrische Methode zur Bestimmung der Cucurbitacine in Melonen unter Verwendung von Ciocalteu-Reagenz.

AUTERHOFF und MÜLLER (44) führten bei Colocynthidis fructus mit dem Hydrolysat des Methanolextraktes eine photometrische Gesamtbestimmung durch: Nach dem Ausschütteln der salzsauren Hydrolyselösung mit Ether werden die Aglykone in Methanol bei 270 nm direkt gemessen. Man erfaßt dabei vor allem Cucurbitacine vom Diosphenoltyp und berechnet auf Cucurbitacin I. Der Einzelfehler dieser Methode betrug bei drei Bestimmungen $\pm$ 0.05 bis $\pm$ 0.2%.

Von LAZUREVSKII und Mitarb. (45) werden die Cucurbitacine in Gurken durch Lumineszenzmessung bestimmt.

VAN KEULEN (46) hat kürzlich für die Bestimmung von Cucurbitacin C in Gurkenblättern eine fluorodensitometrische Methode unter Verwendung von Antimon-III-chlorid (Carr-Price-Reagenz) beschrieben. Der Variationskoeffizient dieser Bestimmung betrug durchschnittlich 3.8%, wobei aber auf jede Platte eine Standardlösung aufgetragen werden muß.

Für die Bestimmung von Cucurbitacin E und I, sowie Cucurbitacin E-glucosid in Gratiolae herba wird von MÜLLER (47) die "in-situ"-Remissionsmessung bei 230 nm nach DC-Trennung (Chloroform-Methanol-Wasser 85:14:1) vorgeschlagen. Für Gratiosid beschreibt er eine indirekte spektralphotometrische Bestimmung, bei der nach DC-Trennung (Chloroform-Methanol-Wasser 80:19:1)

die entsprechende Zone eluiert und die Lösung nach Umsetzung mit p-Dimethylaminobenzaldehyd in verd.Schwefelsäure bei 520 nm gemessen wird.

Bei fast allen bisherigen Methoden handelt es sich somit entweder um die Bestimmung einzelner Cucurbitacine nach vorausgegangener Isolierung, die aufwendig und ungenau ist, oder um eine Gesamtbestimmung im Extrakt.

Lediglich die in-situ-Remissionsmessung der mit DC getrennten Cucurbitacine nach MÜLLER (47) und die fluorodensitometrische Bestimmung von Cucurbitacin C nach VAN KEULEN (46) sind relativ schnell und einfach durchzuführen. Diesen Methoden fehlt es aber an Trennschärfe und Genauigkeit, so daß die quantitative Bestimmung entsprechend große Fehler aufweist. Die Methode von VAN KEULEN (46) ist zudem nur für Cucurbitacine mit freier 3-Hydroxygruppe geeignet.

Für die Standardisierung cucurbitacinhaltiger Drogen war es daher erforderlich, eine Methode zu finden, die selektiv, schnell, einfach, genau, reproduzierbar und quantifizierbar ist. Außerdem sollte die Methode eine Charakterisierung und Unterscheidung, sowie die Qualitätsbeurteilung der einzelnen Drogen ermöglichen.

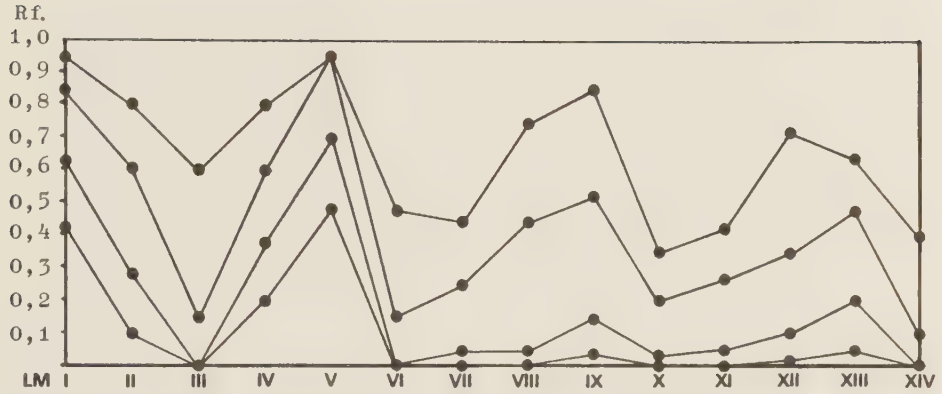
II. Die HPLC-Methode

Die HPLC war bis zum Beginn dieser Arbeit lediglich von KUPCHAN und Mitarb. (48) zur Endreinigung von Cucurbitacin I, das sie durch Hydrolyse von Datiscacin erhalten hatten, verwendet worden. Kürzlich wurden von BALLIANO und Mitarb. (2,49) zwei Arbeiten veröffentlicht, in denen vom Einsatz der reversed-phase HPLC zur Analyse und Reinigung von Biosynthesevorstufen der Cucurbitacine berichtet wird. Sie verwenden eine RP C18-Säule mit Acetonitril bzw. Methanol-Wasser (34:66) als Fließmittel im isokratischen Betrieb.

1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Die DC haben wir zur Extraktüberprüfung und Peakidentifizierung bei der Entwicklung der HPLC-Methode eingesetzt.

Dazu war es nötig, ein möglichst universell verwendbares DC-System zu finden, mit dem sowohl Glykoside als auch Aglykone innerhalb eines weiten Polaritätsbereiches getrennt werden. Da früher bereits zahlreiche DC-Trennsysteme für Cucurbitacine publiziert wurden, konnten diese als Grundlage für Neuentwicklungen dienen. Zur Beurteilung der Trennleistung wurde der Chloroformextrakt von Cayaponia tayuya chromatographiert, da dieser Extrakt das komplexeste Cucurbitacinmuster aufweist. Er enthält Glykoside und Aglykone unterschiedlichster Polarität. Die Ergebnisse des Laufmittelscreenings sind in Abb. 4, S. 13, wiedergegeben.



LM I	Chloroform-Methanol 4:1 (50)
LM II	Chloroform-Methanol 9:1 (50)
LM III	Diethylether-Ethylacetat 4:1 (51)
LM IV	Chloroform-Methanol-Wasser 85:14:1 (47)
LM V	Butanol-Ethylacetat-Wasser 9:10:1 (34)
LM VI	Chloroform-Ethylacetat-Ameisensäure 48:48:4 (52)
LM VII	Chloroform-Ethanol 95:5 (32)
LM VIII	Benzol-Dioxan-Ethylacetat 2:1:1 (34)
LM IX	Ethylacetat (53)
LM X	Trichlorethylen-Isopropanol 10:1 (34)
LM XI	Trichlorethylen-Isopropanol 8:1
LM XII	Trichlorethylen-Isopropanol 6:1
LM XIII	Trichlorethylen-Isopropanol 4:1 (25)
LM XIV	Ethylacetat-Cyclohexan-Methylisobutylketon 10:9:2 (34)

Abb. 4

DC-Trennung der vier Hauptzonen des Chloroformextraktes von Tayuyae radix auf Kieselgel 60 F 254 Fertigplatten. Bei den beiden oberen Zonen handelt es sich um Aglykone, bei den unteren um Glykoside

Man erkennt, daß sich LM II und LM IV für eine gleichzeitige Trennung der Glykoside und Aglykone am besten eignen. LM I und LM V sind ausschließlich für Glykoside, die übrigen nur für die Trennung der Aglykone zu empfehlen. Für unser Cucurbitacinscreening verwendeten wir deshalb bevorzugt LM II (Chloroform-Methanol 9:1) mit Kieselgel 60 F-254 Fertigplatten bzw. Kieselgel 60 F-254 HPTLC Fertigplatten. Im Vergleich zu den Normalplatten sind die R_f-Werte bei letzteren um ca. 0.15 erhöht. Das Laufmittel muß täglich frisch hergestellt werden, da sich die R_f-Werte bei zunehmender Verdunstung des Chloroforms nach oben verschieben.

Als Sprühreagenz wurde in der Regel Vanillin/Phosphorsäure benutzt, das ursprünglich zur Detektion von Steroiden eingesetzt wurde (54). Cucurbitacine fluoreszieren damit rötlich (Δ 23-Cucurbitacine) oder gelb (23,24-Dihydrocucurbitacine) im UV 365 nm (32).

Da aber andere Verbindungen, vor allem die ubiquitär vorkommenden Sterine, ebenfalls rötlich fluoreszieren, ist eine sichere Identifizierung in Frage gestellt.

Zur Detektion der Cucurbitacine mit α-Ketolstruktur wurde das Triphenyltetrazoliumchlorid(TTC)-Reagenz (31) verwendet. Die leicht zu Diosphenolen oxidierbaren Verbindungen reduzieren TTC in alkalischer Lösung zu Formazan, das als rote Zone sichtbar wird.

Diosphenolcucurbitacine wiederum können gut mit alkoholischer Eisen-III-chlorid-Lösung detektiert werden (31). Sie färben sich rotbraun an. Die Platten lassen sich anschließend noch mit Vanillin/Phosphorsäure besprühen.

Eine Fluoreszenzminderung erhält man nur bei Cucurbitacinen mit mindestens einer α,β-ungesättigten Ketogruppe. 1,2,23,24-Tetrahydrocucurbitacine, wie sie vor allem in Cayaponia tayuya vorkommen, ergeben keine Fluoreszenzminderung.

Eine DC-Trennung verschiedener Cucurbitacin-Reinsubstanzen ist in Abb. 5, S. 15, wiedergegeben.

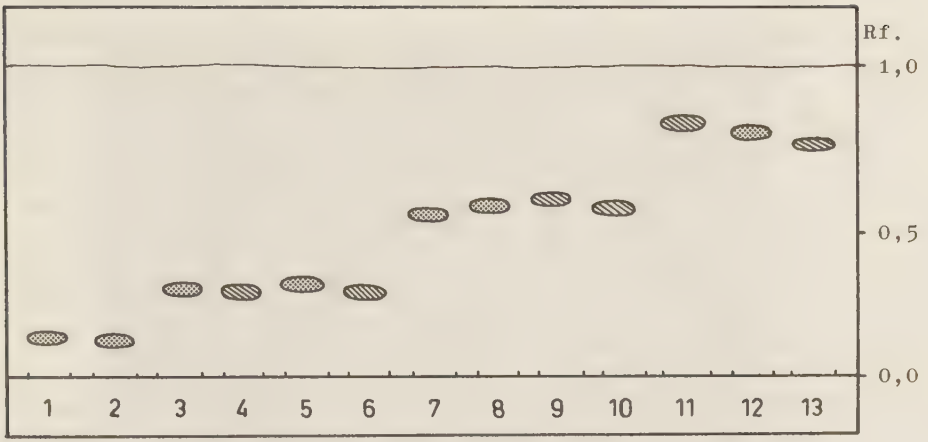


Abb. 5

DC-Trennung verschiedener Cucurbitacin-Reinsubstanzen

Adsorbens: Kieselgel 60 F 254 Fertigplatten
LM: Chloroform-Methanol 9:1
Detektion: Vanillin/Phosphorsäure

= gelb im UV 365 nm

= rötlich im UV 365 nm

1 = Cucurbitacin L-glucosid
2 = Cucurbitacin R-glucosid
3 = 23,24-Dihydrocucurbitacin E-glucosid
4 = Cucurbitacin E-glucosid
5 = 23,24-Dihydrocucurbitacin B-glucosid
6 = Cucurbitacin B-glucosid
7 = Cucurbitacin R
8 = Cucurbitacin L
9 = Cucurbitacin I
10 = Cucurbitacin D
11 = Cucurbitacin E
12 = 23,24-Dihydrocucurbitacin B
13 = Cucurbitacin B

Man erhält eine klare Trennung in Aglykone (R_f-Werte größer 0.4) und Glykoside (R_f-Werte kleiner 0.4). Während die Acetylierung der C-25-Hydroxylgruppe eine deutliche Verschiebung zu höheren R_f-Werten hervorruft, kommt es bei der Hydrierung der 1,2- bzw. 23,24-Doppelbindung nur zu unwesentlichen R_f-Veränderungen. Aus diesem Grund lassen sich entsprechende Cucurbitacinpaare mit diesem allgemeinen DC-System nur sehr schwer oder überhaupt nicht trennen (50).

In Pflanzenextrakten erschweren konzentrationsbedingte R_f-Verschiebungen der Cucurbitacine zusätzlich eine exakte Zuordnung.

Die Verwendung von HPTLC-Platten verbessert zwar die Zonenschärfe, doch reicht diese für eine vollständige Trennung aller Cucurbitacine noch nicht aus.

Abb. 6, S. 17, zeigt die HPTLC-Trennung verschiedener cucurbitacinhaltiger Extrakte:

Colocynthidis fructus

Das Chromatogramm ist durch die rot/gelben Zonenpaare im unteren R_f-Bereich gekennzeichnet. Dabei handelt es sich um die 2-O-Glucoside der Cucurbitacine I (rot; R_f 0.16), E (rot; R_f 0.29) und L (gelb; R_f 0.14), sowie um 23,24-Dihydrocucurbitacin E-glucosid (gelb; R_f 0.30).

Gratiolae herba

Das DC-Bild gleicht dem vorangegangenen im unteren R_f-Bereich; die Glucoside liegen aber in niedrigerer Konzentration vor. Zusätzlich finden sich im oberen R_f-Bereich die Zonen der Cucurbitacine E (rötlich; R_f 0.93) und L (gelb; R_f 0.67).

Ecballii fructus

Das Chromatogramm weist eine Reihe von roten und gelben Zonen auf, die über die ganze Laufhöhe verteilt sind. Es lassen sich neben den Cucurbitacinen E, I und L und deren Glykosiden, Cucurbitacin B (rötlich; R_f 0.90) und dessen 2-O-Glucosid (rötlich; R_f 0.29) zuordnen.

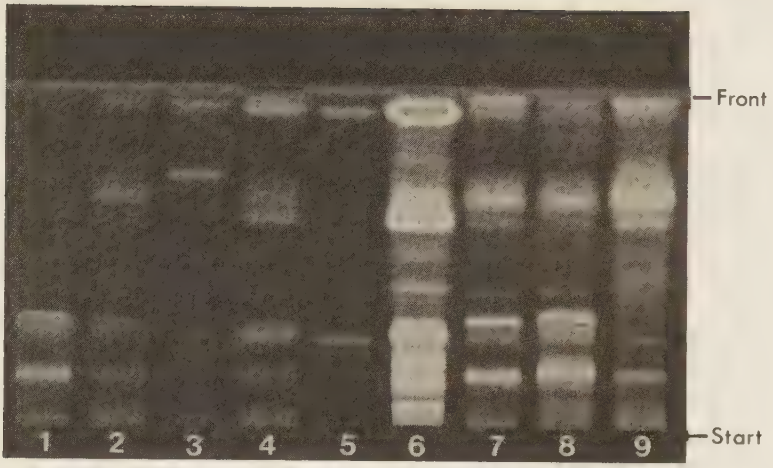


Abb. 6

HPTLC-Trennung verschiedener cucurbitacinhaltiger Extrakte im LM II (Chloroform-Methanol 9:1) nach Detektion mit Vanillin/Phosphorsäure (UV 365 nm); (Erläuterung im Text)

1 = Chloroformextrakt von Colocynthidis fructus
2 = lt. MÜLLER (47) hergestellter Extrakt von Gratiolae herba
3 = Chloroformextrakt von Iberidis semen
4 = Chloroformextrakt von Ecballii fructus
5 = Chloroformextrakt von Luffae fructus
6 = Chloroformextrakt von Tayuyae radix
7 = Chloroformextrakt von getrockneter Bryoniae radix
8 = Ethanolextrakt von frisch geernteter Bryoniae radix
9 = Wasserextrakt von frisch geernteter Bryoniae radix

Luffae fructus

Das DC-Bild ist im wesentlichen durch die Zonen von Cucurbitacin B und dessen Glucosid gekennzeichnet. In geringer Konzentration ist auch Cucurbitacin D (rötlich; R_f 0.63) nachweisbar.

Tayuyae radix

Es herrschen über die gesamte Laufstrecke verteilte gelbe Zonen vor. Bei den Hauptzonen handelt es sich um Cucurbitacin R (gelb; R_f 0.60) und dessen 2-O-Glucosid (gelb; R_f 0.13) sowie um 23,24-Dihydrocucurbitacin B (gelb; R_f 0.90) und das entsprechende Glucosid (gelb; R_f 0.30) (Ergebnisse aus Kapitel 2, S. 71, dieser Arbeit). Die blauen Zonen in der Nähe des Startes (R_f 0.1 und 0.2) stellen Flavonglykoside dar.

Bryoniae radix

Die DC-Bilder von Bryoniae radix sind ebenfalls durch vorwiegend gelbe Zonen charakterisiert. Im mittleren R_f-Bereich treten zusätzlich mehrere rote Zonen auf, die nicht zugeordnet werden konnten. Alle drei Extrakte wurden aus derselben Wurzel (Bryonia cretica ssp. dioica) hergestellt. Man erkennt, daß beim Chloroformextrakt aus der getrockneten Wurzel die Aglykone (Cucurbitacin E, I und L) und deren Glucoside in annähernd gleicher Konzentration erscheinen. Im Ethanolextrakt aus der frisch geernteten Wurzel überwiegen hingegen die Zonen der Glykoside, während beim Wasserextrakt der frischen Wurzel die Zonen der Aglykone vorherrschen. Somit findet bei der Extraktion mit Wasser eine fast vollständige Hydrolyse der ursprünglich genuin in der Pflanze vorliegenden Glykoside statt.

Das Ergebnis der DC-Trennung zeigt, daß cucurbitacinhaltige Pflanzenextrakte zahlreiche Zonenüberlagerungen ergeben. Eine Identifizierung der Zonen ist durch die ähnlichen R_f-Werte mancher Cucurbitacine sehr erschwert. Über die Schwierigkeiten einer quantitativen Auswertung solcher Chromatogramme wurde von MÜLLER (47) bereits berichtet.

Zur ersten Qualitätsbeurteilung cucurbitacinhaltiger Arzneidrogen ist die DC somit zwar geeignet, doch reicht die Trennleistung nicht aus, um exakte Aussagen über die Konzentration der einzelnen Cucurbitacine zu erhalten.

Wir benutzten die DC vor allem zur Identifizierung isolierter Verbindungen aus der HPLC-Trennung und damit zur Entwicklung und Optimierung des HPLC-Trennsystems. Wertvolle Dienste leistete die DC auch für die Unterscheidung der verschiedenen Cucurbitacintypen, da mit den Reagenzien Eisen-III-chlorid, Vanillin/Phosphorsäure und TTC z.T. sehr selektive Detektionsmöglichkeiten zur Verfügung stehen (s.o.).

2. Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

2.1. Probenvorbereitung

Für die spätere quantitative Bestimmung wurde nach einer Methode gesucht, die die Cucurbitacine und ihre Glykoside ohne Verluste möglichst quantitativ aus der Droge zu extrahieren gestattet. Außerdem sollten lipophile und hydrophile Begleitstoffe abgetrennt werden, da sie die HPLC-Trennung stören.

Wir stellten fest, daß man durch Soxhletextraktion der entfetteten Drogen mit Chloroform sowohl Cucurbitacinaglykone als auch -glykoside am besten erfaßt. Dies deckt sich mit den Untersuchungen anderer Autoren (31,32,55). Durch die vorausgehende Entfettung der Drogen mit Petrolether werden lipophile Begleitstoffe entfernt, die sonst die Umkehrphasen der HPLC-Säulen verunreinigen würden. Andererseits verhindert die Extraktion mit Chloroform, daß größere Mengen an polaren Substanzen, wie z.B. Flavonoide und Gerbstoffe in den Extrakt gelangen, die ebenfalls die HPLC-Trennung stören.

Abb. 7, S. 20, zeigt am Beispiel von Tayuyae radix, daß in den Petrolether-bzw. Hexanextrakten und im Ethanolextrakt nur geringe Mengen an Cucurbitacinen nachweisbar sind, und

daß der Chloroformextrakt das gesamte Spektrum der Cucurbitacine enthält und damit als "Cucurbitacinfraktion" gelten kann.

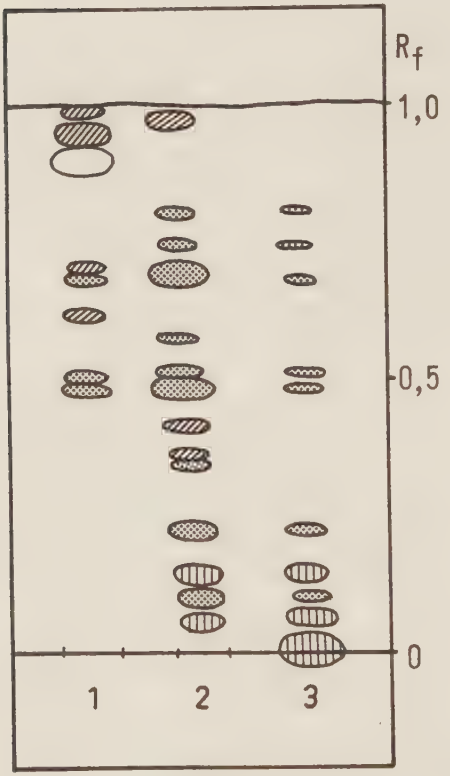


Abb. 7
DC-Trennung der Extrakte aus Tayuyae radix

1 = Hexanextrakt
2 = Chloroformextrakt
3 = Ethanolextrakt

LM: Chloroform-Methanol 9:1
Detektion:
Vanillin/Phosphorsäure

= rot im UV 365 nm
= gelb im UV 365 nm
= blau im UV 365 nm
= blau im UV 365 nm vor dem Besprühen

Die Chloroformextrakte der untersuchten Wurzel-, Frucht- und Samendrogen können direkt für die DC- bzw. HPLC-Analyse verwendet werden.

Bei Herba-Drogen (z.B. Gratiolae herba) ist wegen des hohen Flavonoid- und Chlorophyllgehaltes zu empfehlen, diese Begleitstoffe zuvor abzutrennen, da sie die DC-Trennung stören und die HPLC-Säule belasten.

Zur Anreicherung der Cucurbitacine wird der zur Trockne eingeengte Chloroformextrakt in einer Mischung aus Methanol und Wasser (1:1) suspendiert und zunächst mit Petrolether, dann mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphase kann dann zur Analyse der Cucurbitacine verwendet werden.

Falls dieses Abtrennverfahren nicht ausreicht, kann die Anreicherungsmethode von MÜLLER (47) verwendet werden. Hierbei wird zur Abtrennung der Flavonoide und Gerbstoffe zusätzlich eine Bleifällung, gefolgt von einer nochmaligen Ausschüttelung mit Chloroform (=E1) und Chloroform-Isopropanol (3:2) (=E2), durchgeführt. Es zeigte sich, daß hierbei die polaren Glucoside (Cucurbitacin I- und L-glucosid) in E2 und die weniger polaren Glucoside (Cucurbitacin E-glucosid) und Aglykone in E1 angereichert werden.

Das Schema eines Aufarbeitungsganges ist in Abb. 8, S. 22, wiedergegeben.

Als Analysenlösungen werden ca. 0.5%ige Lösungen der zur Trockne eingeengten Chloroformextrakte bzw. der angereicherten Extrakte in Chloroform/Ethanol verwendet. Der Chloroformanteil sollte dabei möglichst niedrig gehalten werden, da sonst bei der HPLC die mobile Phase verändert wird.

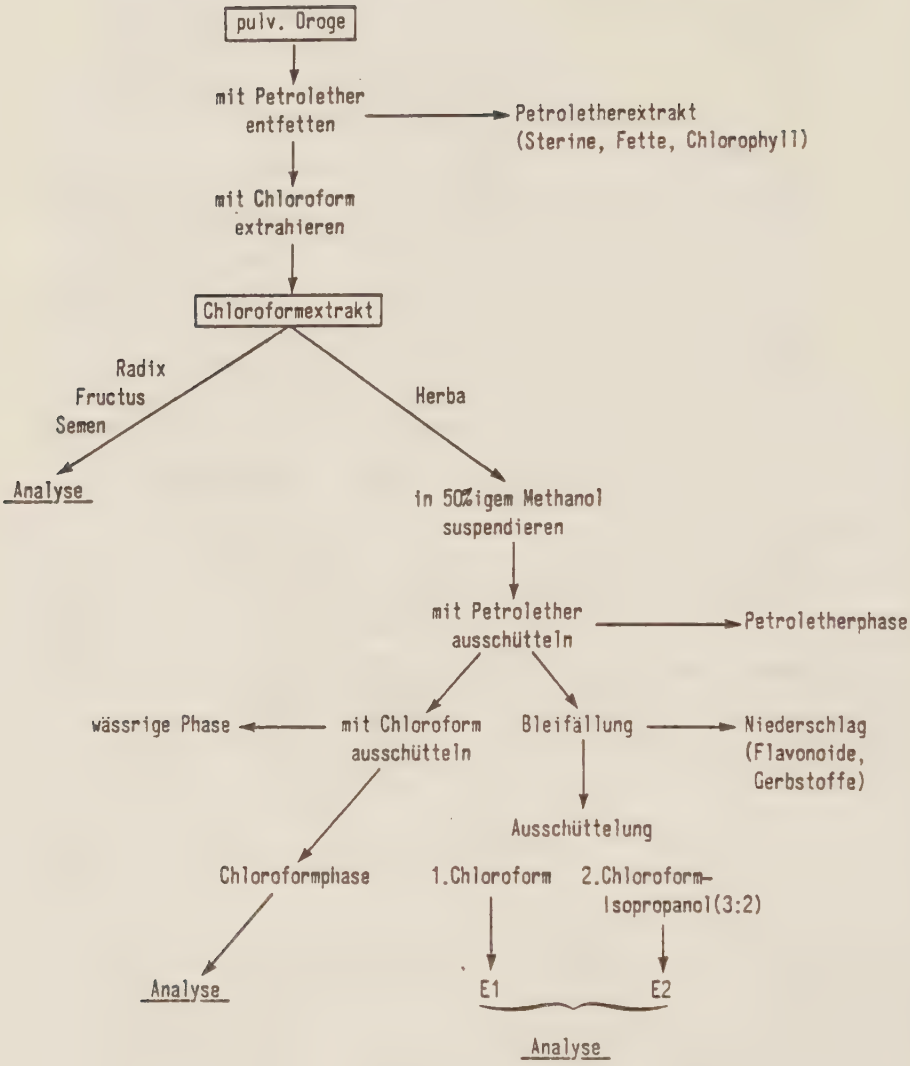


Abb. 8

Aufarbeitungsgang für cucurbitacinhaltige Drogen

2.2. Das HPLC-System

Zur Festlegung der besten Detektionswellenlänge wurden die UV-Spektren der verschiedenen Cucurbitacintypen aufgenommen (vgl. Abb. 9, S. 24). Cucurbitacine mit einer α,β-ungesättigten Ketogruppe in der Seitenkette (z.B. Cucurbitacin E und B) weisen ein Absorptionsmaximum bei 230 nm auf. Diosphenolcucurbitacine (z.B. Cucurbitacin E und L) zeigen ein Maximum bzw. eine Schulter bei 270 nm. 1,2,23,24-Tetrahydrocucurbitacine (z.B. 23,24-Dihydrocucurbitacin B und Cucurbitacin R) besitzen im wesentlichen nur noch eine Endabsorption. Da wir bei der UV-Detektion möglichst alle Cucurbitacintypen gleichzeitig erfassen wollten, waren wir zu einem Kompromiß gezwungen. Wir entschieden uns für 230 nm als Detektionswellenlänge, da hier ein Teil der Cucurbitacine sein Absorptionsmaximum besitzt, andererseits 23,24-Dihydro- und 1,2,23,24-Tetrahydrocucurbitacine noch genügend absorbieren, um sie, wenn auch mit geringerer Empfindlichkeit, noch zu erfassen. Die Detektion bei noch niedrigeren Wellenlängen ist ungünstig, da dann auch Sterine mit erfaßt werden, sodaß die Chromatogramme noch schwerer interpretierbar werden.

Da es sich bei den Cucurbitacinen um polare bis mittelpolare Verbindungen handelt, war die reversed-phase Chromatographie die Methode der Wahl. Die Übernahme des DC-Trennsystemes für die HPLC kam aus mehreren Gründen nicht in Frage:

- die Verwendung von Chloroform als Laufmittel beschränkt die Detektion auf Wellenlängen größer als 245 nm;
- durch den niedrigen Siedepunkt von Chloroform war eine konstante Laufmittelzusammensetzung über einen längeren Zeitraum nicht gewährleistet;
- die polaren Cucurbitacinglykoside machen einen hohen Alkoholanteil im Laufmittel nötig, der durch seinen Wassergehalt die Kieselgelsäule inaktiviert.

Eine C18-Umkehrphase (μ-Bondapak^{R}C18 oder LiChrosorb^{R}RP18) schien uns weit besser geeignet.

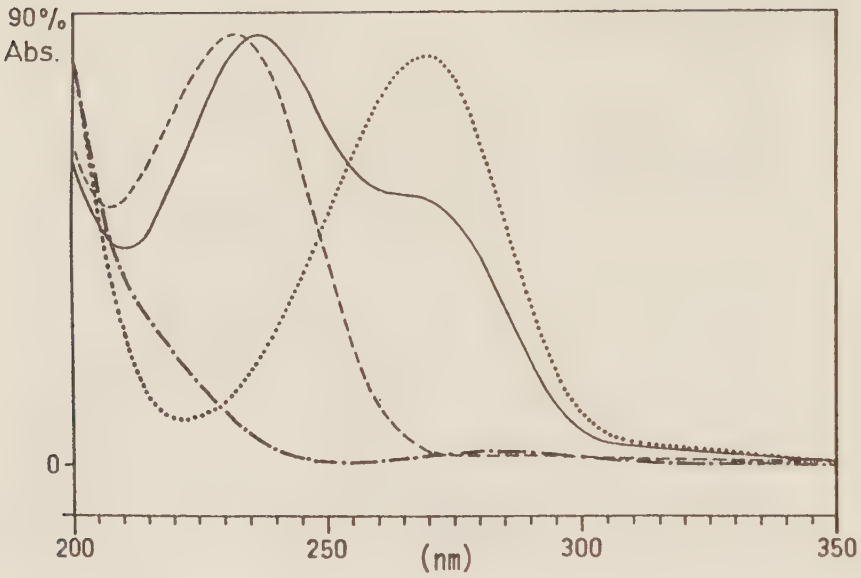


Abb. 9

UV-Spektren der verschiedenen Cucurbitacin-Typen zur Ermittlung geeigneter Detektionswellenlängen für die HPLC-Trennung

——— = Cucurbitacin E (Diosphenol- und Δ23-cucurbitacin)

••••••••• = Cucurbitacin L (Diosphenol- und 23,24-Dihydro-cucurbitacin)

--------- = Cucurbitacin B (1,2-Dihydro- und Δ23-cucurbitacin)

-·-·-·-·- = 23,24-Dihydrocucurbitacin B (1,2,23,24-Tetrahydro-cucurbitacin)

Als mobile Phase verwendeten wir Acetonitril/Wasser-Gemische. Zunächst erwies sich speziell folgendes Trennsystem als gut geeignet:

TS 1:	Säule:	µ-Bondapak C18 (300 x 4 mm ID)
	Fließmittel:	A: 20% Acetonitril
		B: 50% Acetonitril
	Gradient:	von 0% B in 45 min linear auf 100% B
	Durchfluß:	2.0 ml/min
	Detektion:	230 nm/range 0.04

Durch Gradientenelution erreichten wir, daß sowohl Cucurbitacinglykoside als auch -aglykone in einem Analysengang als scharfe Peaks getrennt werden. Es zeigte sich, daß die Elution der Cucurbitacine nicht genau in umgekehrter Reihenfolge zur Kieselgelchromatographie erfolgt. Zwischen beiden Systemen bestehen vielmehr einige charakteristische Selektivitätsunterschiede:

Mit dem HPLC-System erfolgt keine strenge Auftrennung in einen Glykosid- und einen Aglykonbereich. Es werden z.B. die Cucurbitacine A, C und D vor den Glucosiden der Cucurbitacine B und E eluiert. Auch die Elutionsreihenfolge der Aglykone ist gegenüber der DC verändert. Abb. 10, S. 27, zeigt die HPLC-Trennung verschiedener Cucurbitacin-Testsubstanzen.

In Tabelle 3, S. 26, sind die Retentionszeiten in dem beschriebenen HPLC-System den R_f-Werten der DC gegenübergestellt. Die angegebenen absoluten Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkte dienen, da Säulenalterung und unterschiedliche Länge der Verbindungskapillaren zu Verschiebungen führen.

Tabelle 3: Gegenüberstellung der R_f-Werte und der Retentionszeiten von einigen Cucurbitacinen

Substanz	R_f +)	Rt. ++)	RRt. +++)
Cucurbitacin L-2-O-glucosid	0.14	11.1	0.85
Cucurbitacin I-2-O-glucosid	0.16	11.1	0.85
Cucurbitacin B-2-O-glucosid	0.26	20.2	1.55
Cucurbitacin E-2-O-glucosid	0.29	19.5	1.50
23,24-Dihydrocucurbitacin E--2-O-glucosid	0.30	20.6	1.59
Cucurbitacin D	0.63	17.8	1.37
Cucurbitacin C	0.64	18.5	1.42
Cucurbitacin A	0.65	17.3	1.33
Cucurbitacin L	0.67	21.8	1.68
Cucurbitacin I	0.72	21.8	1.68
Cucurbitacin B	0.90	28.5	2.19
23,24-Dihydrocucurbitacin B	0.90	30.0	2.31
Cucurbitacin E	0.93	33.2	2.55
23,24-Dihydrocucurbitacin E	0.94	34.7	2.67

+) ungefähre R_f-Werte mit Kieselgel HPTLC-Platten und dem Laufmittel Chloroform-Methanol 9:1

++) Absolute Retentionszeiten (min) im HPLC-Trennsystem TS 1

+++) Relative Retentionszeiten, bezogen auf p-Hydroxybenzoesäureethylester (Rt. 13.0 min)

Wir stellten fest, daß sich eine Hydrierung der 1,2-Doppelbindung wegen des Verlustes des Diosphenolcharakters auf die HPLC-Trennung wesentlich stärker auswirkt, als die Hydrierung der Seitenkette. So lassen sich z.B. die Cucurbitacine E und B, sowie I und D sehr gut trennen, während Cucurbitacin I und L ungetrennt bleiben. Andererseits werden Cucurbitacin E und 23,24-Dihydrocucurbitacin E getrennt, so daß man vermuten kann, daß sterische Effekte beim Trennprozeß eine große Rolle spielen.

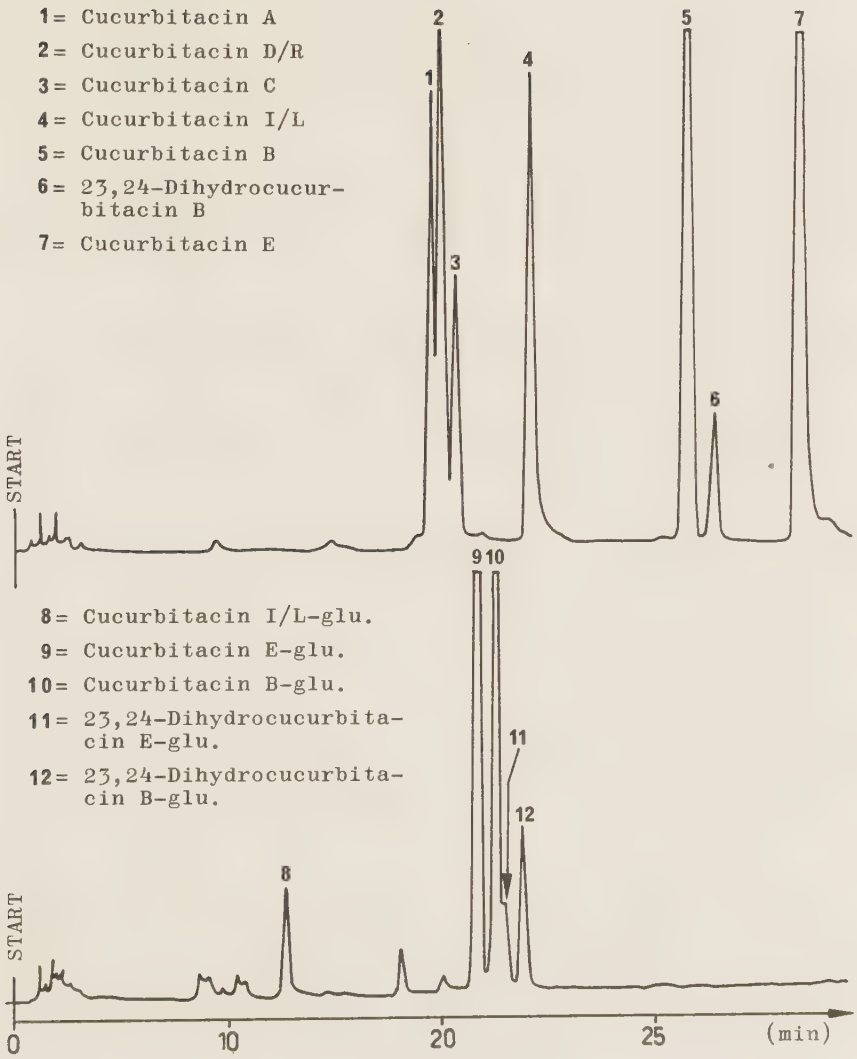


Abb. 10

HPLC-Trennung verschiedener Cucurbitacin-Referenzsubstanzen im Trennsystem TS 1 (230 nm)

Eine Identifizierung der Cucurbitacine, die nicht oder nur kaum getrennt werden, kann also nicht über die Retentionszeit erfolgen. Nur durch Aufnahme mehrerer UV-Spektren während der Elution des Peaks mittels Photodiodenarray-Technik (s.u.) konnten wir feststellen, um welche Verbindungen es sich handelt.

Die Nachweisgrenze für die Cucurbitacine A, B, C, D, E und I liegt bei ungefähr 100 ng (Detektionswellenlänge 230 nm). Die Empfindlichkeit in der DC bewegt sich in derselben Größenordnung.

2.3. Analytische HPLC von cucurbitacinhaltigen Drogenextrakten

Die Kenntnis des Trennverhaltens der Cucurbitacine und der Retentionszeiten der wichtigsten Cucurbitacintypen ermöglichte die HPLC-Analyse cucurbitacinhaltiger Pflanzenextrakte. Durch die Gradientenelution konnte das gesamte in den Extrakten enthaltene Cucurbitacingemisch in einem Analysengang aufgetrennt werden. Außerdem wurden hiermit gleichzeitig auch die lipophilen Komponenten des Extraktes von der Säule gespült, und die nachfolgenden Trennungen dadurch nicht beeinträchtigt.

2.3.1. Peakidentifizierung

Da Pflanzenextrakte in der Regel Multikomponentengemische darstellen, und bei 230 nm nicht nur Cucurbitacine erfaßt werden, stellt die Peakidentifizierung ein wesentliches Problem dar. Um Fehlinterpretationen im Hinblick auf eine quantitative Bestimmung der Cucurbitacine zu vermeiden, konzentrierten wir uns im Folgenden vor allem auf die Identifizierung der in der Literatur beschriebenen Verbindungen. Ein DC-Screening führte zu dem bereits im Teil II. 1. (S.16ff) diskutierten Ergebnis.

2.3.1.1. Vergleich mit Referenzsubstanzen

Durch direkten chromatographischen DC- und HPLC-Vergleich prüften wir auf die Anwesenheit der entsprechenden Verbindungen. Außer den uns zur Verfügung stehenden Δ 23-Cucurbitacinen besaßen wir noch die 23,24-Dihydroverbindungen von Cucurbitacin I, E und B, die wir uns durch katalytische Hydrierung herstellten. Die Ergebnisse dieser Hydrierungen sind in Abb. 11, S. 30, wiedergegeben.

Die Hydrierungsprodukte wurden über ihre UV-Spektren bzw. Massenspektren identifiziert. Am Beispiel der Hydrierung von Cucurbitacin B ist ersichtlich, daß mit Palladium/Aktivkohle als Katalysator bessere Ergebnisse erzielt wurden, als mit Palladium/Calciumcarbonat.

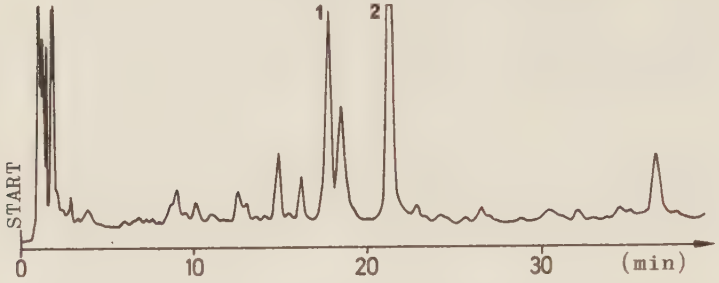
2.3.1.2. On-line Aufnahme der UV-Spektren

Da sich mehrere Cucurbitacine, wie oben erwähnt, mit HPLC (und DC) nicht vollständig trennen lassen, ist die Retentionszeit allein kein Kriterium für die Identität des Peaks.

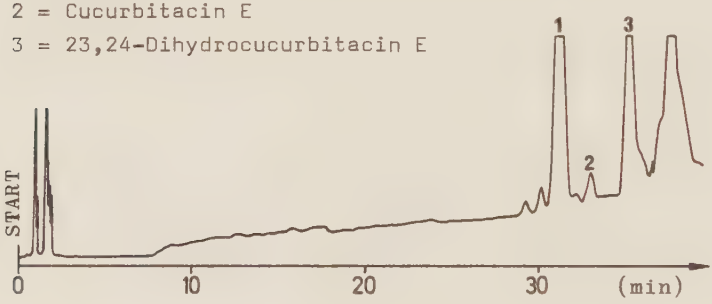
Wegen der unterschiedlichen UV-Spektren der einzelnen Verbindungen (s.o.) war es mittels der neuen Technik des Photodiodenarray (56) möglich, diese "on-line", d.h. ohne Unterbrechung der HPLC-Trennung zu identifizieren.

Die Detektionsmethode mittels Photodiodenarray basiert darauf, daß durch eine große Anzahl nahe beieinanderliegender Photodioden die UV-Absorption laufend über den gesamten Wellenlängenbereich (190-600 nm) gemessen werden kann. Die Ableseintervalle sind im wesentlichen nur noch durch die Datenverarbeitungsgeschwindigkeit begrenzt. Mit dem verwendeten Gerät (HP 1040A von Hewlett Packard) ist es möglich, innerhalb von 10 Millisekunden ein UV-Spektrum aufzunehmen. Der Aufbau des HP 1040A-Detektors ist in Abb. 12, S. 31, wiedergegeben. Man erhält in der HPLC-Detektion somit die Wellenlänge als dritte Dimension (Abb. 13, S. 31). Die hierbei anfallende Datenfülle kann nur mit Hilfe moderner Datenverarbeitung bewältigt werden.

a) Hydrierungsprodukt von Cucurbitacin I (Pd/C);TS 1, 230 nm
1 = 1,2,23,24-Tetrahydrocucurbitacin I (Cucurbitacin R)
2 = 23,24-Dihydrocucurbitacin I (Cucurbitacin L)



b) Hydrierungsprodukt von Cucurbitacin E (Pd/C); TS 1, 200 nm
1 = 1,2,23,24-Tetrahydrocucurbitacin E (23,24-Dihydrocu. B)
2 = Cucurbitacin E
3 = 23,24-Dihydrocucurbitacin E



c) Hydrierungsprodukte von Cucurbitacin B; TS 1, 200 nm
1 = Cucurbitacin B
2 = 23,24-Dihydrocucurbitacin B

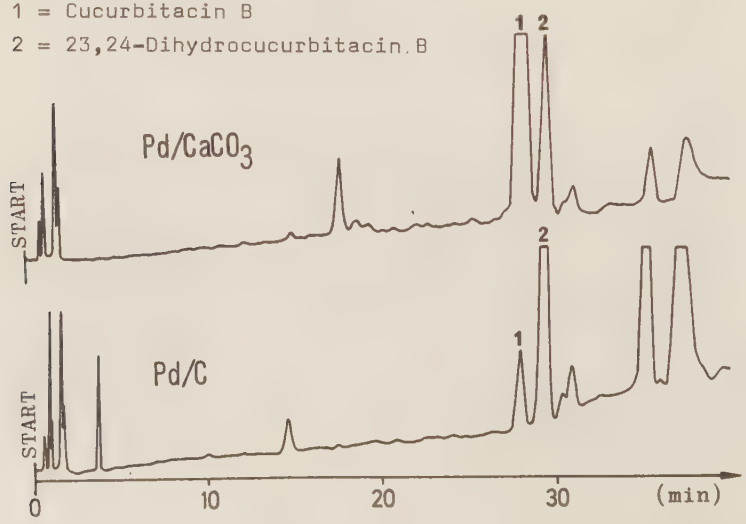


Abb. 11

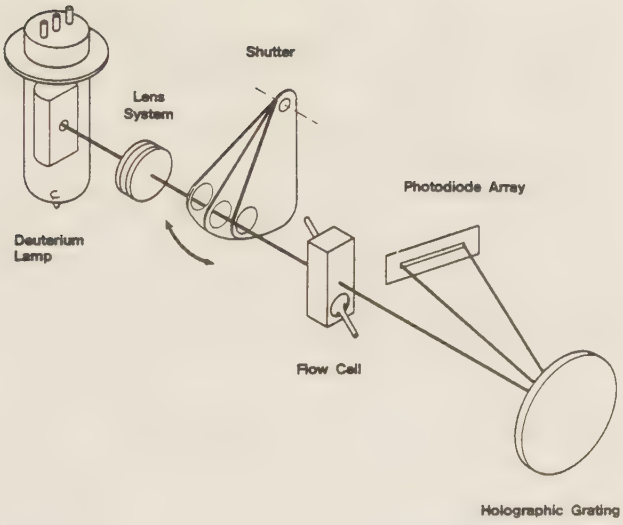


Abb. 12
Schematischer Aufbau des HP 1040A-Detektors (aus: HP 1040A, Operator's Manual, Hewlett Packard, Waldbronn 1982)

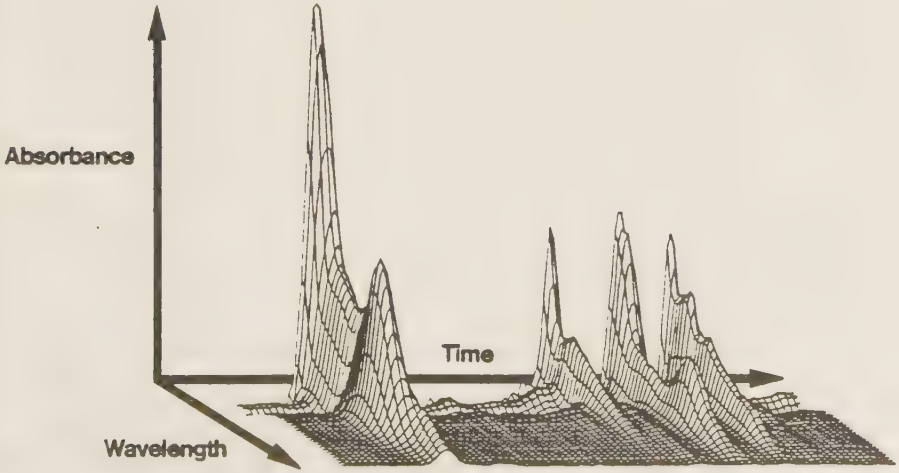


Abb. 13
Dreidimensionale Darstellung einer HPLC-Trennung (aus: HP 1040A, Operator's Manual, Hewlett Packard, Waldbronn 1982)

Der Detektor ist daher mit einem Tischcomputer (HP 85, Hewlett Packard) und einem Diskettenlaufwerk (HP 82901, Hewlett Packard) gekoppelt. Auf diese Weise können nach Beendigung der Analyse von allen Peaks die UV-Spektren abgerufen werden.
Daneben ist es möglich, das Chromatogramm bei verschiedenen Wellenlängen ausdrucken zu lassen. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit besteht darin, daß man die UV-Spektren eines Peaks an der aufsteigenden Flanke, an der Spitze und in der absteigenden Flanke aufnimmt, und sie normalisiert übereinanderdrucken läßt. Stimmen die drei Spektren überein, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um einen "reinen" Peak. Sind die Spektren unterschiedlich, liegt vermutlich ein Substanzgemisch vor. Diese Aussage gilt natürlich nur für Verbindungen mit unterschiedlichen UV-Spektren.

2.3.1.3. Off-line Aufnahme der Massenspektren

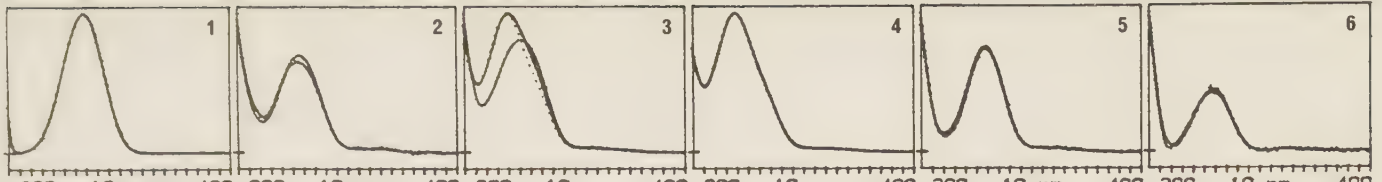
Durch Auffangen der Peaks aus der semipräparativen HPLC-Trennung eines Extraktes ist es möglich, innerhalb kürzester Zeit geringe Mengen (µg-mg) an Reinsubstanzen zu erhalten, die für die Aufnahme eines Massenspektrums ausreichen.

Diese Methode der Identifizierung haben wir vor allem bei Cayaponia tayuya verwendet, da hier noch keinerlei Angaben über die Inhaltsstoffe vorlagen. Die Massenspektren wurden mit schonenden Ionisierungstechniken (FAB und DCI) aufgenommen, da mit der herkömmlichen EI-MS-Technik meist keine Molekülionen erhalten werden konnten.

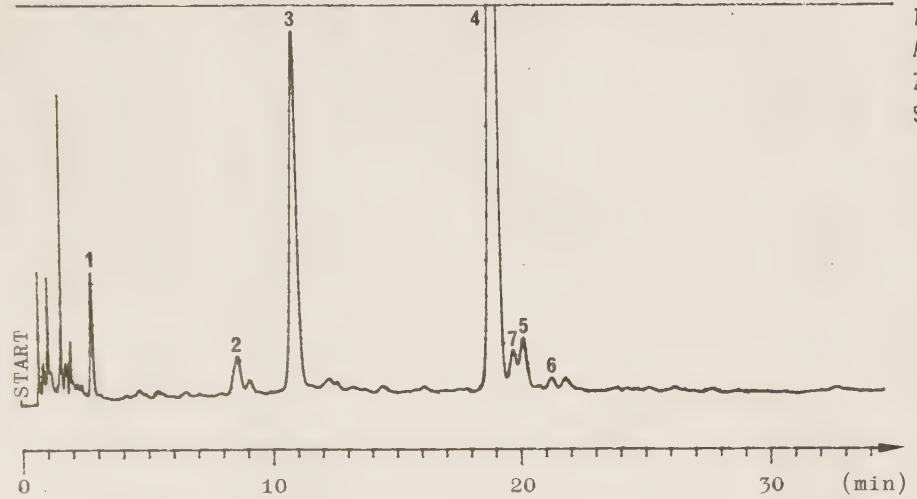
2.3.2. Beschreibung der Chromatogramme

2.3.2.1. Colocynthidis fructus

Nach DAB 6 und HAB 1934 werden die getrockneten, geschälten und entkernten reifen Früchte von Citrullus colocynthis (L.)SCHRAD. (Cucurbitaceae) verwendet. Sie enthalten nach bisherigen Untersuchungen (5,31,41,57) die 2-O-Glucoside der Cucurbitacine E, I und L. Das Fehlen von Aglykonen begründen ENSLIN und Mitarb. (58) mit der Abwesenheit der β-Glucosidase "Elaterase".



Sample	Reference	Attn	Sample	Reference	Attn	Sample	Reference	Attn	Sample	Reference	Attn	Sample	Reference	Attn	Sample	Reference	Attn
2.755	2.603	284	8.591	0.000	44	10.929	9.266	105	18.960	0.000	922	20.199	19.471	49	21.254	20.610	21
2.705	2.603	136	8.408	0.000	28	10.791	9.266	78	18.830	0.000	198	20.008	19.471	31	21.137	20.810	13
2.755	2.603	284	8.708	0.000	28	11.082	9.266	54	19.079	0.000	200	20.257	19.471	30	21.371	20.610	12



Inj.Time: 02:39
Attn [mAU]: 100.0 (247.0)
Zero%: 10%
Signal: B: 2.0 Set

Wavelengths
1 . 200. 4
2 . 230. 4
3 . 254. 4
4 . 270. 4
5 . 300. 4
6 . 340. 4
7 . 510. 40
8 . 550. 100

1 = nicht identifiziert
2 = nicht identifiziert
3 = Cucurbitacin I/L-glucosid
4 = Cucurbitacin E-glucosid
5 = 23,24-Dihydrocucurbitacin E-glu.
6 = nicht identifiziert
7 = Cucurbitacin B-glucosid

Abb. 14

HPLC-Trennung des Chloroformextraktes von Colocynthidis fructus (TS 1; 230 nm) und UV-Spektren der Hauptpeaks

In Abb. 14, S. 33, ist das typische Bild einer HPLC-Trennung des Chloroformextraktes von Colocynthidis fructus zusammen mit den UV-Spektren der Hauptpeaks wiedergegeben.

Das Chromatogramm ist gekennzeichnet durch die in hoher Konzentration auftretenden Glucoside der Cucurbitacine E, I und L. Daß sowohl Cucurbitacin I- als auch L-glucosid vorliegen, konnten wir durch Aufnahme von mehreren UV-Spektren während der Elution des Peaks (Rt. 10.9228) feststellen. Während in der aufsteigenden Flanke das UV-Spektrum von Cucurbitacin L-glucosid zu erkennen ist, erfolgt später ein Übergang zum Spektrum von Cucurbitacin I-glucosid, das in der absteigenden Flanke überwiegt (vgl. Abb. 15).

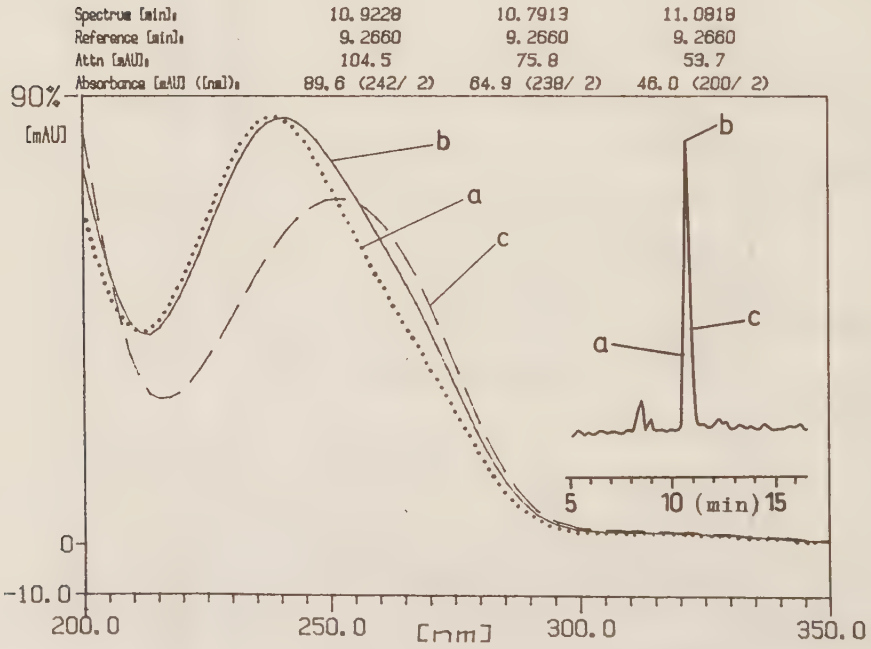


Abb. 15

UV-Spektren des Peaks mit der Retentionszeit von 10.9228 min aus Abb. 14, S. 33, an der aufsteigenden Flanke (a), der Spitze (b) und der absteigenden Flanke (c) aufgenommen

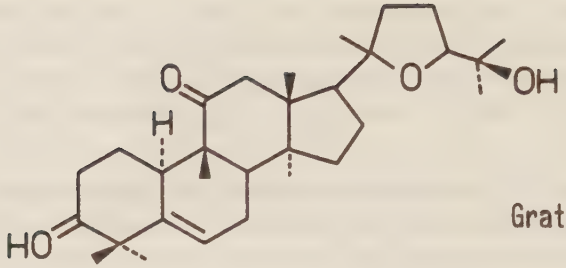
Nach den UV-Spektren der übrigen Peaks dürften in geringer Konzentration noch Cucurbitacin B-glucosid und 23,24-Dihydrocucurbitacin E-glucosid vorliegen. Aglykone, die erfahrungsgemäß im Rt-Bereich von 21 bis 33 min auftreten, sind nicht nachzuweisen.

Ein ähnliches HPLC-Bild wie der Chloroformextrakt ergibt auch die homöopathische Urtinktur, wenn sie ohne weitere Aufarbeitung direkt eingespritzt wird. Es treten allerdings zusätzliche Peaks im Startbereich auf, eine Folge der nach § 4, HAB 1934 vorgeschriebenen Extraktion mit 90%igem Ethanol, da hierdurch polare Substanzen, wie z.B. Flavonoide, auch mitextrahiert werden. Die Nachweisgrenze für die Cucurbitacine liegt ohne Anreicherung bei der Verdünnung D3.

Für eine quantitative Bestimmung der Cucurbitacine in Colocynthidis fructus ist die Detektion bei 270 nm am besten geeignet, da hier die Diosphenolcucurbitacine am selektivsten erfaßt werden.

2.3.2.2. Gratiolae herba

Die im Erg.B.6 noch offizinelle Droge besteht aus den zur Blütezeit gesammelten und getrockneten oberirdischen Teilen von Gratiola officinalis L. (Scrophulariaceae). Das HAB 1934 verwendet das frische, vor der Blütezeit gesammelte Kraut.
Nach TSCHESCHE (59) enthält die Droge die Cucurbitacine Gratiosid (=Gratiogenin-diglucosid), Gratioligenin (= Gratiogenin-monoglucosid), Gratiogenin, 16-Hydroxygratiogenin und Cucurbitacin L. GMELIN (36) und LE MEN (60) konnten Cucurbitacin E-2-O-glucosid (=Elaterinid), das nach MÜLLER (24) mit dem von KRUG (61) isolierten "Gratiotoxin" identisch ist, identifizieren. Die Droge enthält nach GMELIN (36) außerdem Cucurbitacin I-2-O-glucosid und die Cucurbitacine E und I als Aglykone. Im Preßsaft konnte er nur die freien Aglykone nachweisen. MÜLLER (47) fand in der getrockneten Droge Cucurbitacin L-2-O-glucosid neben Cucurbitacin I- und E-glucosid.



Gratiogenin

Wir konnten mit Hilfe der HPLC in den nach der Methode von MÜLLER (47) hergestellten Extrakten handelsüblicher Drogen die mengenmäßig dominierenden Glucoside der Cucurbitacine E, I und L nachweisen. Zusätzlich sind auch die Aglykone enthalten. In geringer Konzentration fanden wir 23,24-Dihydrocucurbitacin E-glucosid. Gratiosid, das ebenfalls zu den Hauptinhaltsstoffen zählt, ist nur durch Detektion bei 200 nm zu erfassen.

In Abb. 16, S. 37, ist das HPLC-Chromatogramm des Extraktes von Gratiolae herba bei verschiedenen Wellenlängen wiedergegeben. Bei den bei 340 nm detektierbaren Substanzen handelt es sich vermutlich um Flavonoide. Es ist deutlich zu erkennen, daß Gratiosid, sowie einige weitere Peaks erst bei 200 nm sichtbar werden.

Gratiolae herba läßt sich auf diese Weise gut von Colocynthidis fructus unterscheiden, das bei 230 nm einen ähnlichen Cucurbitacinfingerprint ergibt.

In Gratiola-Urtinktur, die nach §2, HAB 1934 hergestellt wird, waren ohne Anreicherung mit HPLC nur Spuren der Cucurbitacine nachweisbar. Polare Substanzen im Startbereich, vermutlich Flavonoide, bestimmen das chromatographische Bild.
Für die Gehaltsbestimmung der Cucurbitacine in Gratiolae herba wurde von MÜLLER (47) die Remissionsmessung bei 230 nm nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung

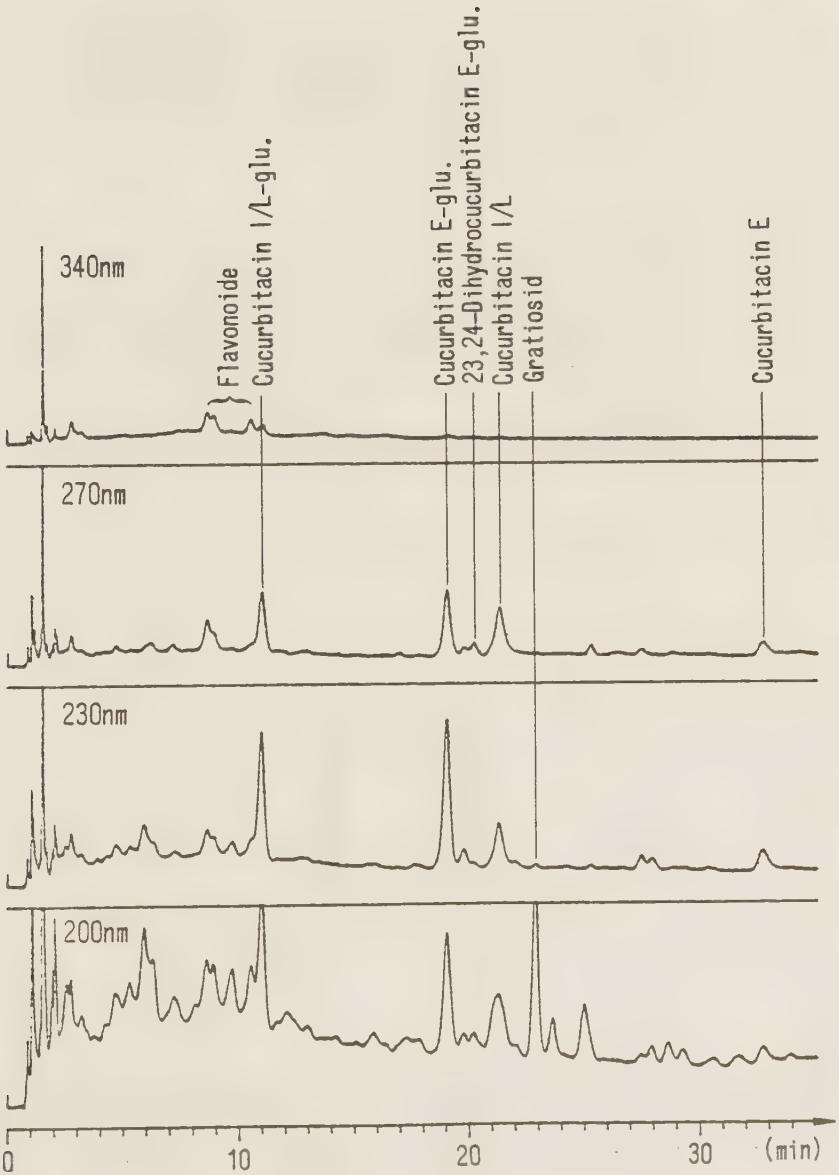


Abb. 16

HPLC-Trennung eines nach MÜLLER (47) hergestellten Extraktes von Gratiolae herba bei verschiedenen Wellenlängen (TS 1)

vorgeschlagen. Wegen der einfacheren Handhabung, der besseren Reproduzierbarkeit und größeren Trennschärfe hat demgegenüber die HPLC-Methode eindeutige Vorteile. Durch Detektion bei 200 nm kann gleichzeitig auch Gratiosid bestimmt werden.

2.3.2.3. Luffae fructus

"Luffaschwämmchen" bestehen aus dem lockeren Fasergerüst der reifen Früchte von Luffa operculata COGN. (=Luffa purgans MART.)(Cucurbitaceae). Die Droge enthält nach KLOSS (62) die Cucurbitacine B (1.9%) und D (1.8%), sowie vier weitere, bisher nicht identifizierte Cucurbitacine. MATOS (63) beschreibt das Vorkommen von Isocucurbitacin B.

Nach unseren Erfahrungen enthält handelsübliche Luffa-Droge überwiegend Cucurbitacin B und dessen 2-O-Glucosid. Cucurbitacin D ist in geringerer Konzentration enthalten. Das typische Bild einer HPLC-Trennung des Chloroformextraktes von Luffae fructus ist in Abb. 17 zu sehen.

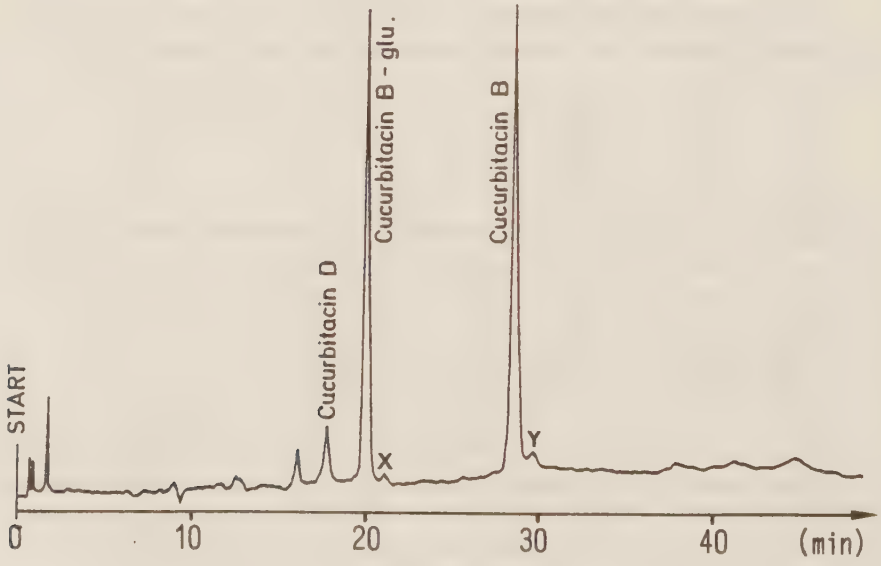


Abb. 17

HPLC-Trennung des Chloroformextraktes von Luffae fructus (TS 1; 230 nm)

Die zwei kleinen Peaks X und Y haben das gleiche UV-Spektrum wie die beiden benachbarten Peaks. Damit handelt es sich nicht um die 23,24-Dihydroverbindungen, sondern möglicherweise um Isomere von Cucurbitacin B und Cucurbitacin B-glucosid.

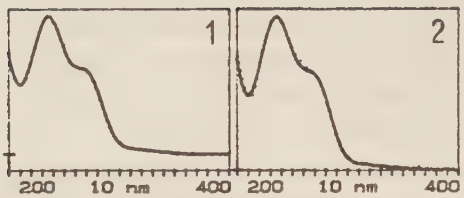
Obwohl Luffa-Urtinktur nach § 4, HAB 1934 durch Perkolation hergestellt wird, waren ohne Anreicherung nur geringe Mengen der oben erwähnten Cucurbitacine zu erkennen. Im Chromatogramm konnten wir hauptsächlich polare Substanzen im Startbereich nachweisen. Wir führen dies auf die hohe Polarität des Lösungsmittels (60%iges Ethanol) zurück.
Die quantitative Bestimmung der Cucurbitacine von Luffae fructus ist ausführlich im Abschnitt 2.7. (S. 57) behandelt.

2.3.2.4. Iberidis semen

Die reifen Samen der Bitteren Schleifenblume, Iberis amara L. (Brassicaceae), sind im HAB 1934 als Droge aufgeführt.
Die Samen der Gattung Iberis wurden von GMELIN und Mitarb. (32,64,65) sowie CURTIS und MEADE (52) bereits eingehend auf Cucurbitacine untersucht. Aus Iberis amara sind bisher die Cucurbitacine E, I, J und K isoliert worden (32,65).

Wir konnten mit Hilfe der HPLC im Chloroformextrakt der Samen nur die Cucurbitacine E und I nachweisen. Die Cucurbitacine J und K konnten nicht gefunden werden.
Abb. 18, S. 40, zeigt das Chromatogramm, sowie die zur Identifizierung der Cucurbitacine E und I verwendeten UV-Spektren.

Der Chloroformextrakt war, obwohl er einen hohen Fettanteil besitzt, direkt mit HPLC chromatographierbar. Es empfiehlt sich aber zur Schonung der Trennsäule, durch eine Extraktion nach BREDENBERG und GMELIN (65) die lipophilen Substanzen vorher abzutrennen.



1 = Cucurbitacin I

2 = Cucurbitacin E

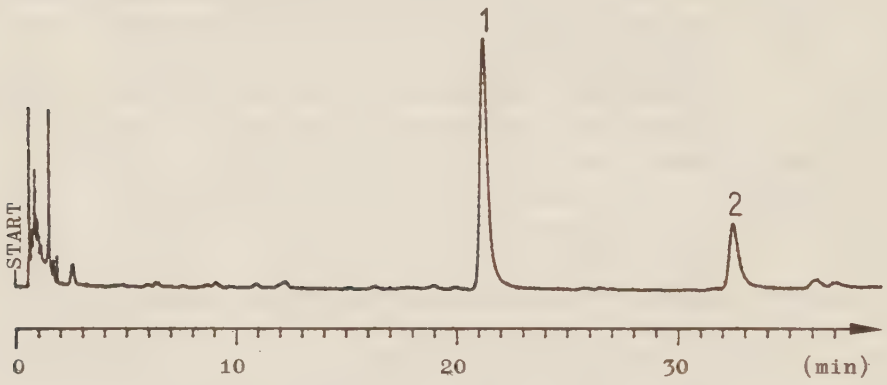


Abb. 18

HPLC-Trennung des Chloroformextraktes von Iberidis semen (TS 1; 230 nm) und UV-Spektren der Hauptpeaks

In der Urtinktur von Iberis amara sind die Cucurbitacine E und I direkt nachweisbar. Zusätzliche Peaks im Startbereich sind wieder auf das polare Extraktionsmittel (60%iges Ethanol; Perkolation nach § 4, HAB 1934) zurückzuführen.

Die quantitative Bestimmung der Cucurbitacine ist mittels Externem Standard möglich, da die Cucurbitacine E und I käuflich erhältlich sind.

2.3.2.5. Ecballii fructus

Die im HAB 1934 als "Elaterium" offizinellen, noch nicht ganz reifen Früchte von Ecballium elaterium (L.)A.RICH. (Cucurbitaceae) enthalten lt. HAGER (9) vierzehn Bitterstoffe, die Cucurbitacine A bis N. LAVIE und Mitarb. (66-70) konnten bisher die Cucurbitacine B, D, E, I, L und R, Anhydro-22-deoxo-3-epi-isocucurbitacin D, Hexanorcucurbitacin I und 16-Deoxy- Δ16-hexanorcucurbitacin D identifizieren. REHM und Mitarb. (31) fanden vorwiegend die Glykoside der Cucurbitacine B, D, E und I. SEIFERT und ELGAMAL (71) isolierten die 2-O-β-D-Glucopyranoside von Cucurbitacin B und D.

Das HPLC-Chromatogramm des Chloroformextraktes, sowie die zur Identifizierung der Hauptpeaks verwendeten UV-Spektren sind in Abb. 19, S. 42, wiedergegeben. Es dominieren die Glucoside von Cucurbitacin E und B. Außerdem sind Cucurbitacin I- und L-glucosid, sowie die Aglykone B und E deutlich zu erkennen. In geringer Konzentration treten die Cucurbitacine D, I und L auf. Mit Hilfe der UV-Spektren ließ sich zeigen, daß Cucurbitacin L-glucosid und Cucurbitacin L nur in sehr geringen Mengen vorkommen. Es überwiegen somit die Δ23-Cucurbitacine.

In der "Elaterium"-Urtinktur konnten die entsprechenden Verbindungen nicht nachgewiesen werden, da die Herstellungsweise (§1, HAB 1934; der Preßsaft wird mit 90%igem Ethanol 1:1 gemischt und anschließend filtriert) hauptsächlich sehr polare Substanzen erfaßt und zu stark verdünnten Lösungen führt. Mit Hilfe der HPLC waren nur Verbindungen im Startbereich zu erkennen.

Die quantitative Bestimmung ist am besten bei 250 nm möglich, da hier die oben beschriebenen Cucurbitacine insgesamt die höchste Absorption besitzen.

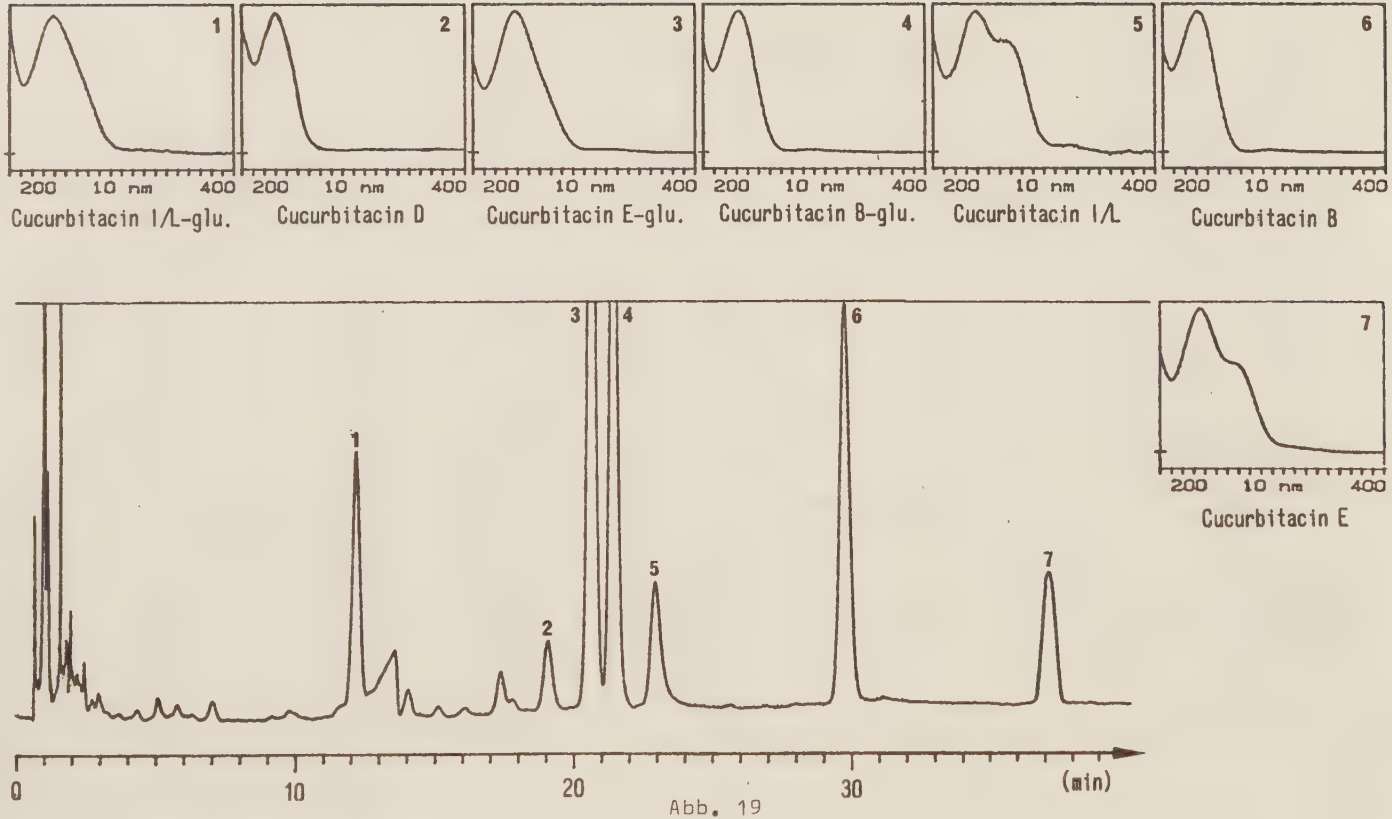


Abb. 19

HPLC-Trennung des Chloroformextraktes von Ecballii fructus (TS 1; 230 nm) sowie die UV-Spektren der Hauptpeaks

2.3.2.6. Tayuyae radix

Die Wurzel der südamerikanischen Cucurbitaceae Cayaponia tayuya (VELL.)COGN. wurde von uns erstmals auf Cucurbitacine untersucht. Die Identifizierung der einzelnen Inhaltsstoffe wird ausführlich in Kapitel 2, S. 71, behandelt.

Abb. 20 zeigt das HPLC-Chromatogramm des Chloroformextraktes mit den von uns identifizierten Verbindungen.

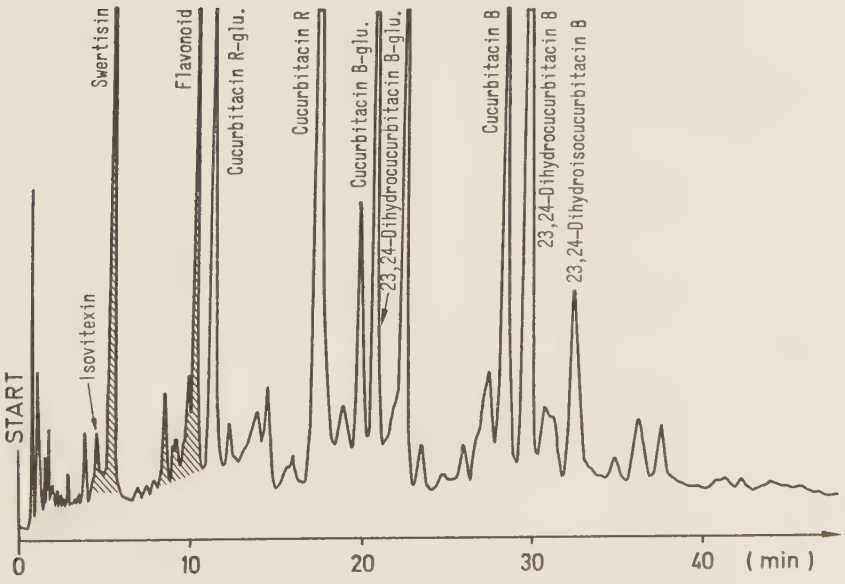


Abb. 20

HPLC-Trennung des Chloroformextraktes von Tayuyae radix
(TS 1; 230 nm)

2.3.2.7. Bryoniae radix

Unter der Bezeichnung Bryoniae radix befinden sich die Wurzeln sowohl von Bryonia alba L. als auch von B.cretica L. ssp. dioica (JACQ.)TUTIN (=Bryonia dioica JACQ.) (Cucurbitaceae) im Handel. Während das HAB 1934 noch beide Arten zuließ, darf lt. HAB 1 nur noch die letztgenannte Art verwendet werden. Da aber die Wurzeln der beiden Arten gleiches Aussehen besitzen, ist es sehr schwierig, bei den im Handel befindlichen Drogen mit Sicherheit die botanische Identität anzugeben.

Bezüglich der Inhaltsstoffe der beiden Arten liegen widersprüchliche Angaben vor (vgl. Tab. 4, S. 45). Als weitere Erschwernis bei der Beurteilung der Drogen kommt hinzu, daß von mehreren Autoren (3,72) eine starke Abhängigkeit der Cucurbitacinführung vom Alter der Wurzel beschrieben wird. Allerdings kam POHLMANN (72) auf Grund von DC-Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß beide Arten, wenn sie zum gleichen Zeitpunkt geerntet und extrahiert werden, und wenn das gleiche Extraktionsverfahren angewendet wird, dieselbe qualitative Cucurbitacin-Zusammensetzung haben.

Für unsere Untersuchungen stand uns zunächst nur eine authentische Wurzel von Bryonia cretica ssp. dioica zur Verfügung. Da es sich um eine frisch geerntete Wurzel handelte, konnten wir gleichzeitig durch HPLC den Einfluß der Trocknung und der Extraktionsart auf das Cucurbitacinmuster studieren (vgl. Abb. 21, S. 47).

Die frische Wurzel wurde in vier Teile längsgeteilt und jeder Teil unterschiedlich behandelt:

a) Die Extraktion der frischen Wurzel mit Ethanol führt zu einer Inaktivierung der glykosidspaltenden Elaterase. Man erhält auf diese Weise das genuin vorliegende Cucurbitacinmuster. Bei den nachgewiesenen Verbindungen handelt es sich vorwiegend um die 2-O-Glucoside der Cucurbitacine E, I und L. In Spuren treten 23,24-Dihydrocucurbitacin E-glucosid und die Aglykone I und L auf.

Tabelle 4: Bisher in Bryoniae radix nachgewiesene Cucurbitacine

Bryonia-Art	Nachgewiesene Cucurbitacine	Literatur
Bryonia alba	Cucurbitacine B, D, E und I	REHM (31)
	Cucurbitacine B, D, E, I, J, K, L und 1,2,23,24-Tetrahydrocucurbitacin I	KONOPA (55)
	Cucurbitacine B, D, E, I und L	KONOPA (73)
	1,2,23,24-Tetrahydrocucurbitacin I, 23,24-Dihydrocucurbitacin B, 2-O-β-D-Glucopyranosyl-1,2,23,24-tetrahydrocucurbitacin I, 25-O-β-D-Glucopyranosyl-1,2,23,24-tetrahydrocucurbitacin I, 2,25-Di-(O-β-D-glucopyranosyl)-1,2,23,24-tetrahydrocucurbitacin I	PANOSYAN (74)
	Iso-23,24-dihydrocucurbitacin D, sowie dessen 2-O- und 25-O-Glucosid und 2,25-O-Diglucosid	PANOSYAN (75)
Bryonia dioica	Bryodulcosid (=Bryodulcosigeninglucoglucorhamnosid)	TUNMANN (76)
	Bryogeninglucorhamnosid	BIGLINO (77)
	Bryosid (=Bryosigeninglykosid)	TUNMANN (78)
	Bryonosid (=Bryodulcosigenin-3-O-rhamnoglucosid-25-O-diglucosid)	HYLANDS (79)
	Bryosid (=Bryodulcosigenin-3-O-rhamnoglucosid-25-O-glucosid)	HYLANDS (79)
	Bryoamarid (=Cucurbitacin L-2-O-glucosid)	TUNMANN (80)
	Cucurbitacine E, I, B und D	REHM (31)
	Cucurbitacine L, J und K; 23,24-Dihydrocucurbitacin B, 23,24-Dihydrocucurbitacin E, 1,2,23,24-Tetrahydrocucurbitacin I (teilweise glykosidiert)	GMELIN (33)
	Cucurbitacin L, 23,24-Dihydrocucurbitacin B, 1,2,23,24-Tetrahydrocucurbitacin I	DUNCAN (81)
	Cucurbitacine I und L, Bryoamarid, 25-O-Acetylbryoamarid, Elaterinid (=2-O-β-D-Glucopyranosyl-cucurbitacin E), 2-O-β-D-Glucopyranosyl-cucurbitacin I	RIPPERGER (50)
	Cucurbitacin S	HYLANDS (82,83)

b) Wird die gleiche Wurzel mit Wasser extrahiert, so werden sämtliche Glykoside durch die Elaterase innerhalb kürzester Zeit hydrolysiert. Es sind dann nur noch die Aglykone Cucurbitacin E, I und L nachweisbar.

c) Wird die Wurzel gefriergetrocknet und dann extrahiert (allg. Extraktionsgang), so werden die Glykoside nur teilweise gespalten. Man erhält Aglykone und Glucoside nebeneinander. Zum gleichen Ergebnis führt die Extraktion luftgetrockneter Droge.

Man gewinnt somit in Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial und der Extraktionsart von einer Wurzel völlig unterschiedliche Cucurbitacinmuster.

Solange jedoch noch keine detaillierten Studien über die pharmakologische Wirkung der einzelnen Cucurbitacine vorliegen, kann keine Wertung dieser Extraktionsmethoden vorgenommen werden.

Das HAB 1 läßt Urtinkturen aus Bryoniae radix nach Vorschrift 2a HAB 1 (Mazeration mit 86%igem Ethanol) aus der frischen, vor der Blütezeit geernteten Wurzel herstellen. Da diese Ethanolkonzentration ausreicht, um die Enzyme zu denaturieren, waren hauptsächlich Cucurbitacinglykoside zu erwarten. Es ließen sich aber auch nach Anreicherung nur Cucurbitacinaglykone nachweisen, was auf eine Hydrolyse bei der Lagerung hindeutet.

Die quantitative Bestimmung der Cucurbitacine in verschiedenen Bryoniae radix-Chargen wird im Abschnitt 2.8., S. 63, behandelt.

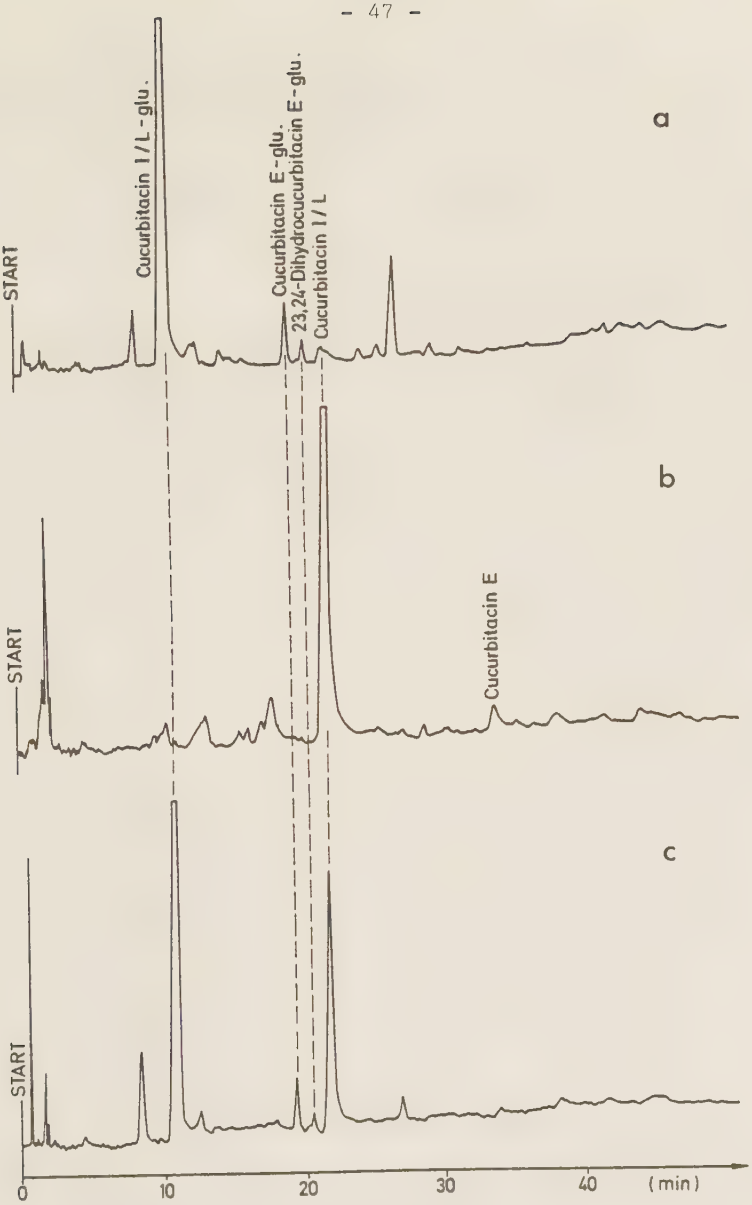


Abb. 21

HPLC-Trennung (TS 1) von auf unterschiedliche Weise hergestellten Extrakten von Bryoniae radix (Bryonia cretica ssp. dioica)

a) Ethanolextrakt der frisch geernteten Wurzel
b) Wasserextrakt der frisch geernteten Wurzel
c) Chloroformextrakt der gefriergetrockneten Wurzel

2.4. Analytische HPLC von cucurbitacinhaltigen Phytopräparaten

Nachdem sich gezeigt hatte, daß alle untersuchten cucurbitacinhaltigen Drogen charakteristische HPLC-Fingerprints ergeben, wurde versucht, die Cucurbitacine mit dieser Methode auch in Phytopräparaten nachzuweisen.

2.4.1. Colocynthis Homaccord^{R}-Tropfen

Im Falle des homöopathischen Mischpräparates Colocynthis Homaccord^{R} (Fa.Heel), das "Gnaphalium polycephalum" und "Colocynthis" in einer Verdünnung von jeweils ca. D4 enthält$^{+)}$, konnten sowohl durch Ausschütteln der Lösung mit Chloroform als auch durch bloßes Einengen der Probe auf ein Vierzigstel des ursprünglichen Volumens HPLC-Fingerprints erhalten werden, die im wesentlichen dem Cucurbitacinmuster von Colocynthidis fructus entsprachen. Mit Hilfe der Photodiodenarray-Technik wurden die Peaks der Glucoside von Cucurbitacin E, I und L sicher identifiziert (siehe Abb. 22, S. 49).

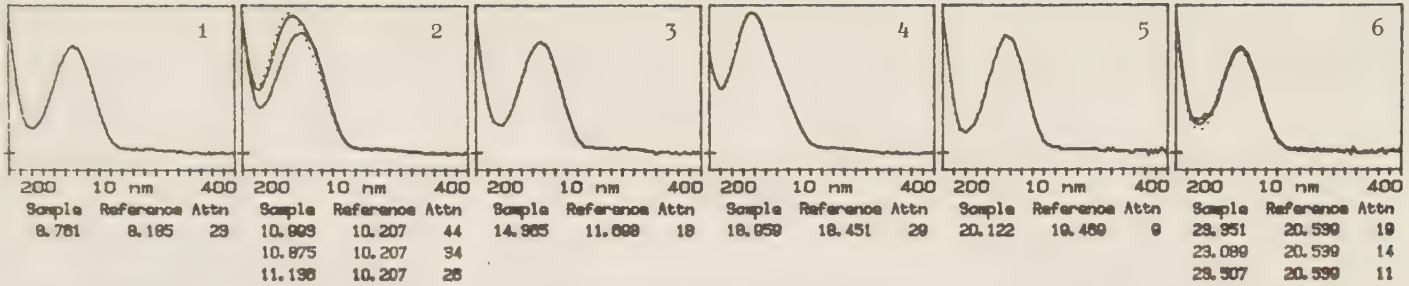
2.4.2. Pilfor^{R}-Dragees

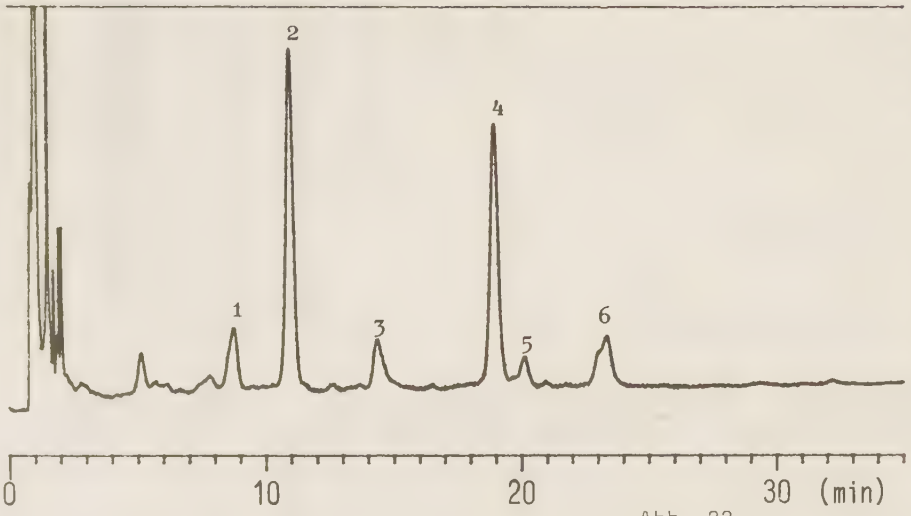
Pilfor^{R}-Dragees (Fa.Sagittawerk) enthalten neben einer Reihe anderer Auszüge Extr.Colocynthidis (DAB 6)$^{++)}$. Die HPLC eines angereicherten Extraktes der Dragees ergab im Cucurbitacin-System eine gute Auftrennung der Inhaltsstoffe. Bei den Peaks, die im Bereich der Retentionszeiten der Koloquinten-Cucurbitacine liegen, handelt es sich jedoch, wie wir durch Messung der UV-Spektren mittels Photodiodenarray feststellen konnten, um Anthraglykoside. Cucurbitacine konnten wir auf diese Weise nicht detektieren. Abb. 23, S. 50, zeigt die HPLC-Trennung sowie die UV-Spektren der Hauptpeaks.

Zusammensetzung der Präparate:

+) 100 ml Colocynthis Homaccord^{R} enth.: Colocynthis D2, Colocynthis D10, Colocynthis D30, Colocynthis D200 ana 0.8 ml; Gnaphalium polycephalum D1, Gnaph.polyc.D10, Gnaph.polyc.D30, Gnaph.polyc.D200 ana 0.2 ml; Äthanol 35% (ml/ml) ad 100 ml.

++) 1 Dragee Pilfor^{R} enthält: Aloin 6.25 mg, Extr.Aloes 62.5 mg, Extr.Belladonnae 2.75 mg, Extr.Colocynthid. 12.5 mg, Extr.Rhei 31.5 mg, Resina Jalapae e rad. 18.7 mg, Rhizoma Rhei 3.15 mg.





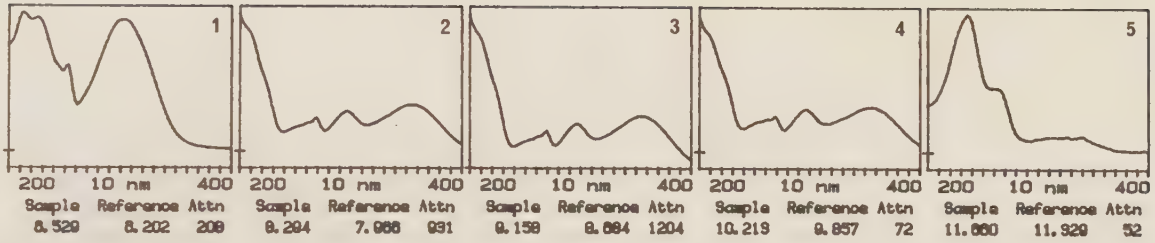
Inj. Time: 13:56
Attn [mAU]: 40.0 (116.0)
Zero%: 10%
Signal: B: 2.0 Set

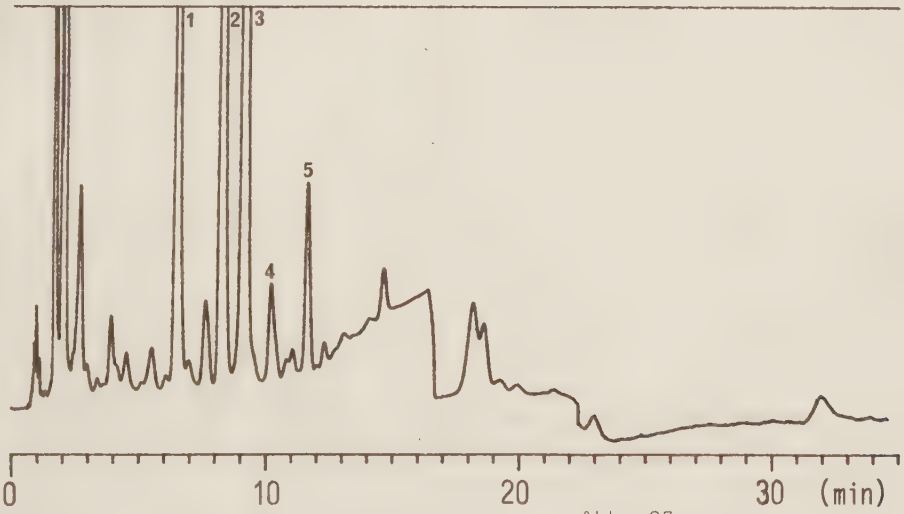
Wavelengths
1 . 200. 4
2 . 230. 4
3 . 254. 4
4 . 270. 4
5 . 300. 4
6 . 340. 4
7 . 510. 40
8 . 550.100

1 = nicht identifiziert
2 = Cucurbitacin I/L-glucosid
3 = nicht identifiziert
4 = Cucurbitacin E-glucosid
5 = 23,24-Dihydrocucurbitacin E-glu.
6 = nicht identifiziert

Abb. 22

HPLC-Trennung eines angereicherten Extraktes von Colocynthis Homaccord^{R} (TS 1; 230 nm)





Inj. Time: 17:57
Attn [mAU]: 100.0 (679.4)
Zero%: 10%

Abb. 23

HPLC-Trennung eines Extraktes aus Pilfor^{R}-Dragees (TS 1; 230 nm) und die UV-Spektren der Hauptpeaks

2.4.3. Rheogen^{R}-Dragees

Rheogen^{R}-Dragees (Fa.Robugen), die ebenfalls Koloquintenextrakt enthalten$^{+)}$, wurden mit demselben HPLC-System untersucht. Wiederum waren nur die Peaks der Anthraglykoside zu erkennen. Das Chromatogramm glich dem von Pilfor^{R}-Dragees (Abb. 23, S. 50).

Es macht somit Schwierigkeiten, Cucurbitacinglykoside neben gleichzeitig vorliegenden Anthrachinonglykosiden nachzuweisen, besonders wenn die letzteren in vergleichsweise hoher Konzentration vorliegen. Die Retentionsbereiche der beiden Stoffklassen überlappen sich und die sichere Identifizierung der Peaks ist nur mit Photodiodenarray-Detektion möglich. Eine selektive Extraktion der Cucurbitacine scheiterte bisher.

+) 1 Dragee Rheogen^{R} enthält: Rhiz.Rhei 20 mg, Extr.Aloes (harzfrei) 80 mg, Extr.Colocynthidis 8 mg, Extr.Belladonnae 4 mg.

2.5. Versuche zur Optimierung der HPLC-Trennung der Cucurbitacine

Zunächst versuchten wir durch Verwendung von Methanol anstelle von Acetonitril eine andere Selektivität zu erhalten, um die mit dem oben beschriebenen HPLC-System nicht trennbaren Cucurbitacinpaare (z.B. Cucurbitacin I und L) zu trennen. Es zeigte sich, daß ungefähr die doppelte Methanolkonzentration notwendig war, um für den Chloroformextrakt von Tayuyae radix eine dem Acetonitril-System entsprechende Trennung zu erhalten (vgl. Abb. 24).

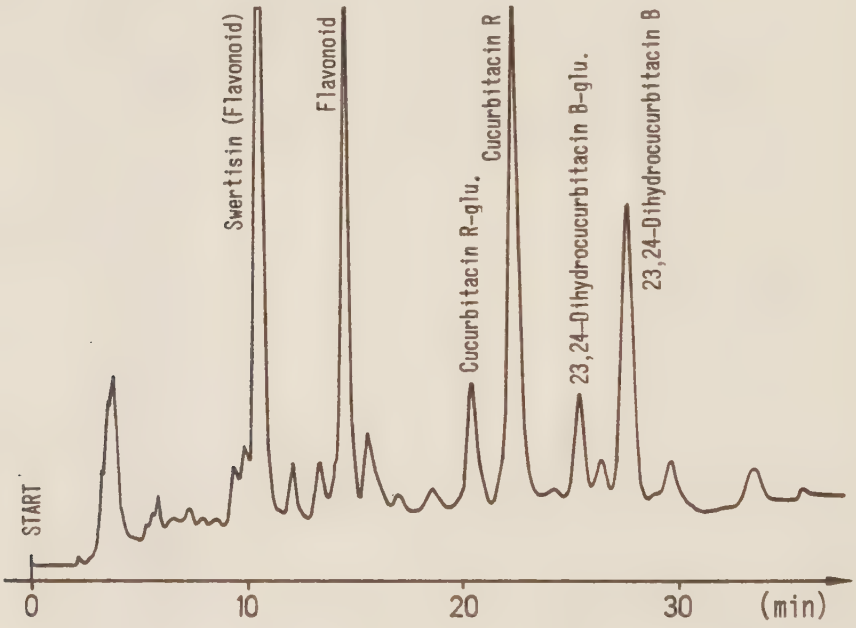


Abb. 24

HPLC-Trennung des Chloroformextraktes von Tayuyae radix unter Verwendung von Methanol in der mobilen Phase (TS 2; 230 nm)

Säule: µ-Bondapak^{R}C18 (300 x 7.9 mm ID)
Fließmittel: A: Methanol-Wasser 50:50
B: Methanol-Wasser 80:20
Gradient: von 0% B linear in 30 min auf 100% B
Durchfluß: 2 ml/min

Die Trennung war aber insgesamt schlechter als mit dem Acetonitril-System. Eine Auflösung von Cucurbitacin I und L war nicht möglich. Da zudem eine allgemeine Peakverbreiterung erfolgt, verwendeten wir im Folgenden nur noch Acetonitril.

Ein Versuch, die kritischen Cucurbitacinpaare durch eine langsamere Erhöhung der Acetonitrilkonzentration bzw. durch isokratische Arbeitsweise zu trennen, führte auch zu keinem positiven Ergebnis.

Andere Säulenmaterialien (5 µ Nucleosil^{R}RP18, 5 µ und 10 µ LiChrosorb^{R}RP18) brachten ebenfalls keinen Erfolg.

Als positives Resultat bleibt festzuhalten, daß die HPLC-Trennung der Extrakte mit dem optimierten System "25% Acetonitril linear in 30 min auf 45% Acetonitril; 2ml/min" (TS 5) innerhalb kürzerer Analysenzeiten (30 min) möglich ist. Bei Verwendung der 5 µ LiChrosorb^{R}RP18-Säule erreicht man bei einem Durchfluß von 1 ml/min ebenfalls eine Trennung in 30 min.

Eine weitere Optimierung wäre bei den weniger komplex zusammengesetzten Extrakten (z.B. aus Iberidis semen und Colocynthidis fructus) noch möglich.

2.6. Präparative HPLC von Extr. Colocynthidis

Um zu überprüfen, ob die analytische HPLC-Trennung auch auf den präparativen Maßstab zu übertragen ist, versuchten wir, durch HPLC die Hauptinhaltsstoffe von Colocynthidis fructus zu isolieren.

Der Chloroformextrakt von Colocynthidis fructus enthält vor allem die Glucoside der Cucurbitacine E, I und L. Um diese vorzutrennen und für die präparative HPLC anzureichern, wurde zunächst eine Flüssig-Flüssig-Verteilung zwischen Chloroform und Wasser durchgeführt. In der Chloroformphase (Fraktion I) fand sich Cucurbitacin E-glucosid angereichert. Durch Ausschütteln der wässrigen Phase mit Chloroform-Isopropanol (3:2) erhielten wir Fraktion II mit den polaren Glykosiden, vor allem Cucurbitacin I- und L-glucosid (vgl. Abb. 25, S. 55).

Die so erhaltenen Fraktionen wurden umgefällt und dann für die semipräparative HPLC verwendet. Sie erfolgte in Durchgängen von je 2 mg Substanz. Aus insgesamt 20 mg Fraktion II wurden auf diese Weise folgende Ausbeuten erzielt:

Peak 1: 1.7 mg
Peak 2: 7.1 mg (Cucurbitacin I- und L-glucosid)
Peak 3: 2.4 mg (Cucurbitacin E-glucosid)

Die semipräparative HPLC-Isolierung ist in Abb. 26, S. 56, dargestellt.

Es ist somit möglich, die analytische Trennung in den semipräparativen Maßstab zu übertragen und Cucurbitacine durch HPLC im Milligrammaßstab innerhalb relativ kurzer Zeit zu isolieren. So lassen sich auf einfache Weise Referenzsubstanzen für eine quantitative Bestimmung gewinnen.

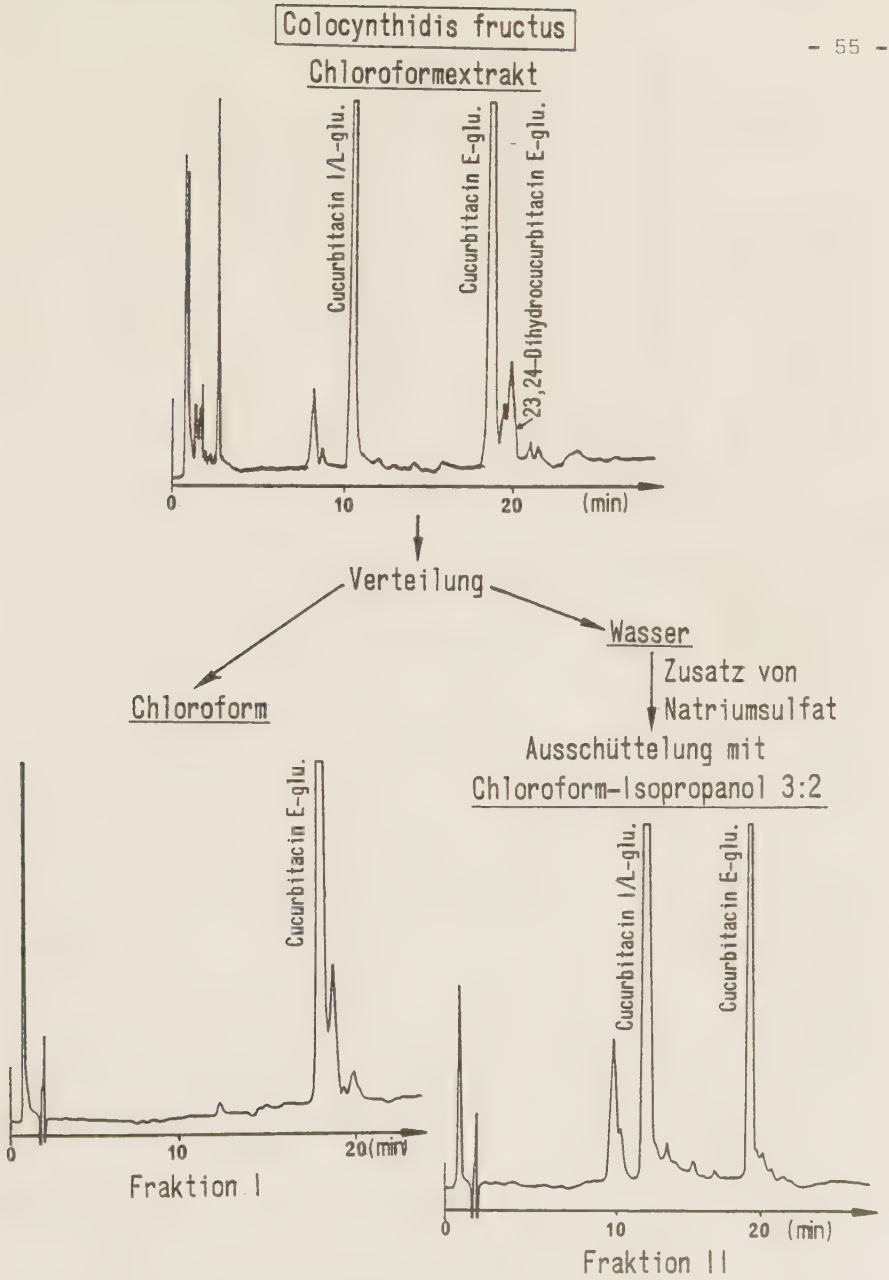


Abb. 25

Anreicherung und Vorfraktionierung der Cucurbitacine aus Colocynthidis fructus

(HPLC: TS 1; vgl.Exp.Teil)

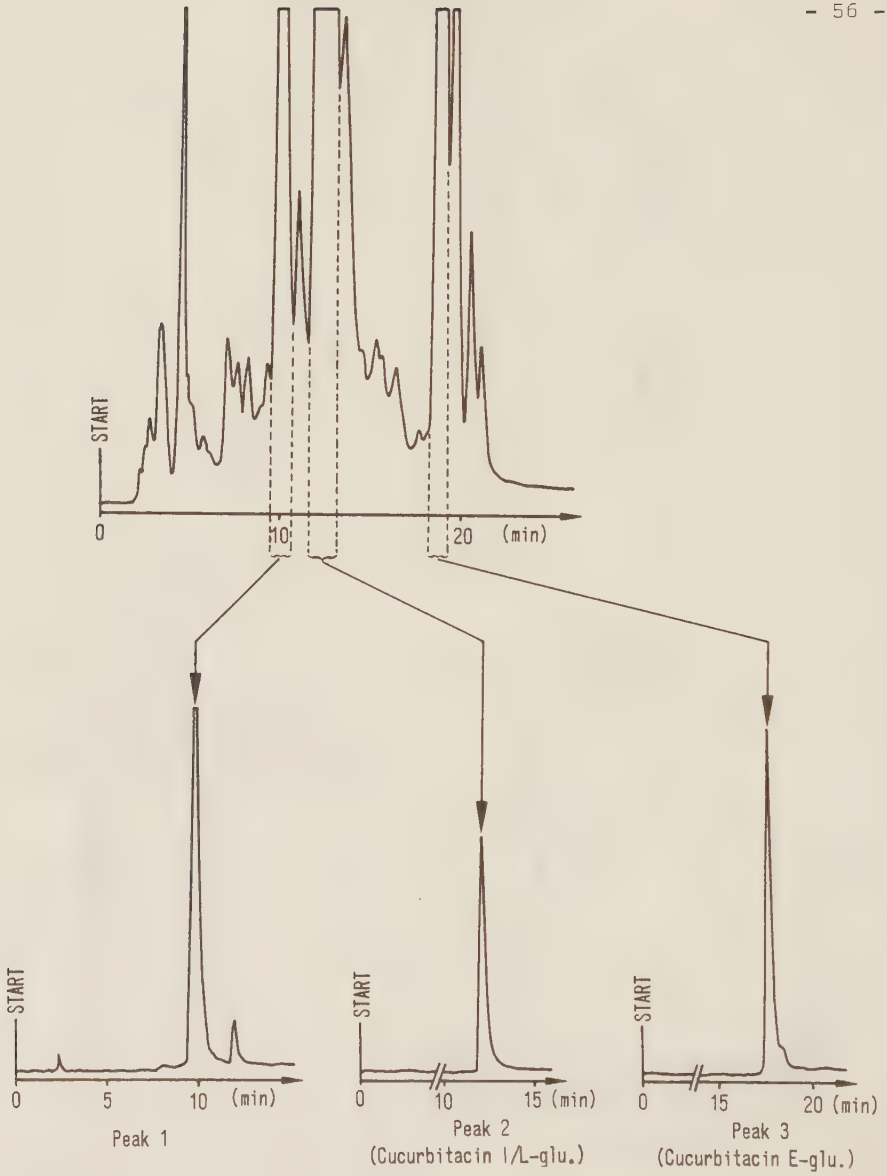


Abb. 26
Semipräparative HPLC-Trennung der Fraktion II von Colocynthidis fructus
(TS 9; vgl. Exp.Teil)

2.7. Quantitative Bestimmung der Cucurbitacine durch HPLC dargestellt am Beispiel Luffae fructus

Die quantitative Bestimmung der Cucurbitacine erfolgte bisher mit den im Abschnitt I. 4. (S. 9) beschriebenen Verfahren. Mit der HPLC-Methode besteht eine einfache, schnelle und selektive Möglichkeit, alle Cucurbitacine in einem Analysengang zu bestimmen.

Die verschiedenen Möglichkeiten der quantitativen Auswertung von HPLC-Trennungen sind schon von TITTEL (84) beschrieben worden. Bedingt durch die inzwischen erfolgte Weiterentwicklung auf dem Gebiet der Integratoren (Datensysteme) und der mittlerweile zur Verfügung stehenden Säulen mit erhöhter Trennleistung, hat sich nunmehr die Auswertung über die Peakflächen durchgesetzt. Wir verwendeten die Methode des Inneren Standards, da sie mit einer relativen Standardabweichung von weniger als 0.5% (nach LEITCH (85)) nach wie vor als die genaueste angesehen werden kann.

Für Luffae fructus stellt p-Hydroxybenzoesäureethylester einen geeigneten Inneren Standard dar. Die Eichung erfolgte mit Hilfe der Reinsubstanzen Cucurbitacin B, Cucurbitacin D und Cucurbitacin B-glucosid, den Hauptinhaltsstoffen von Luffa operculata. Die elektronisch ermittelten Responsefaktoren ($RF = \frac{\text{Menge}}{\text{Fläche}} \times 1000$) sind in Tabelle 5, S. 58, aufgelistet.

Um zu überprüfen, wieweit eine lineare Abhängigkeit zwischen Menge (µg) und Peakfläche besteht, wurden unterschiedliche Mengen der Eichlösung eingespritzt. Das Ergebnis zeigt Abb. 27, S. 58.

Demnach besteht zumindest im Bereich von 1 - 20 µg ein lineares Verhältnis zwischen Menge und Peakfläche. Es zeigte sich auch, daß Cucurbitacin B und D praktisch identische Korrekturfaktoren aufweisen. Dies war zu erwarten, da beide nahezu gleiches Molekulargewicht besitzen (558 bzw. 516) und die zusätzliche Acetylgruppe bei Cucurbitacin B nur wenig Einfluß auf die Absorption bei 230 nm ausübt.

Tabelle 5: Responsefaktoren von den Cucurbitacinen B, D und B-glucosid, sowie von p-Hydroxybenzoesäureethylester

$RF = \frac{\text{Menge}}{\text{Fläche}} \times 10^{3}$ +)	Cu. B	Cu. D	Cu. B-glu.	pHBEE
1.Bestimmung	$1.200 \cdot 10^{-3}$	$1.190 \cdot 10^{-3}$	$2.030 \cdot 10^{-3}$	$8.600 \cdot 10^{-4}$
2.Bestimmung	$1.202 \cdot 10^{-3}$	$1.188 \cdot 10^{-3}$	$1.992 \cdot 10^{-3}$	$8.576 \cdot 10^{-4}$
3.Bestimmung	$1.218 \cdot 10^{-3}$	$1.209 \cdot 10^{-3}$	$2.060 \cdot 10^{-3}$	$8.672 \cdot 10^{-4}$
Mittelwert	$1.207 \cdot 10^{-3}$	$1.196 \cdot 10^{-3}$	$2.027 \cdot 10^{-3}$	$8.616 \cdot 10^{-4}$

+) bestimmt mit 5.0 µl Eichlösung; bezogen auf die Menge der eingewogenen Testsubstanzen

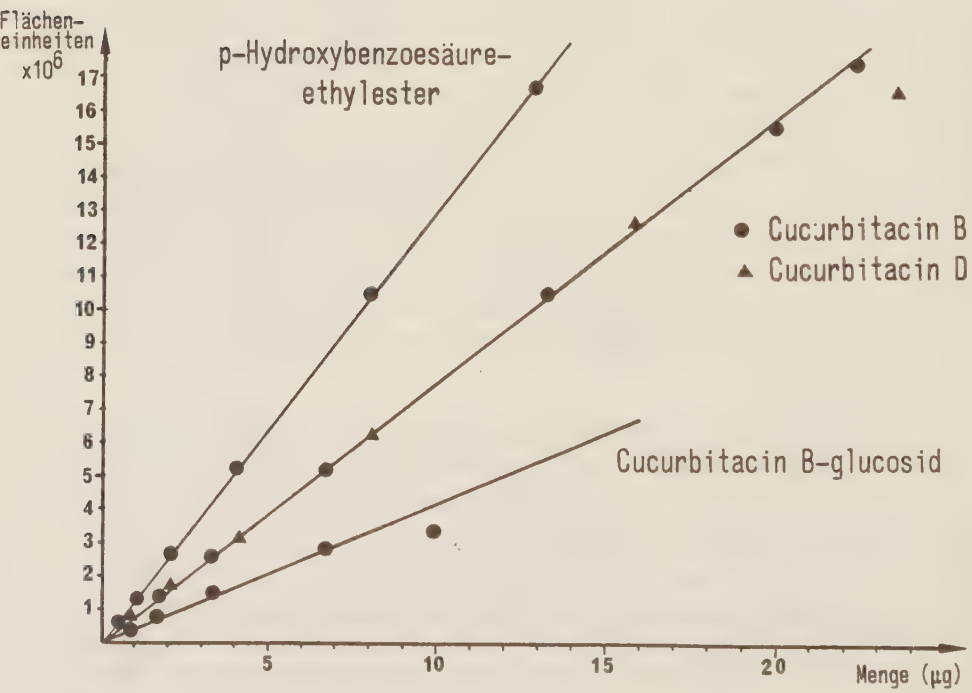


Abb. 27

Abhängigkeit der Peakfläche von der Einspritzmenge

Allgemein kann daraus abgeleitet werden, daß für alle Cucurbitacine, die die gleichen Chromophoren besitzen und sich nur durch eine Acetylgruppe unterscheiden, der gleiche Korrekturfaktor verwendet werden kann.

Für unterschiedliche Molekulargewichte gilt für die Extinktionen E_X und E_Y von zwei Substanzen X und Y bei gleicher molarer Extinktion (gleichen Chromophoren) und bei gleicher Konzentration:

$$\frac{E_X}{E_Y} = \frac{MG_Y}{MG_X} ; \qquad E_X = E_Y \cdot \frac{MG_Y}{MG_X}$$

Die Extinktionen verhalten sich umgekehrt zu den Molekulargewichten. Da die Peakflächen (Ar) eine Funktion der Extinktion sind, gilt auch:

$$Ar_X = Ar_Y \cdot \frac{MG_Y}{MG_X}$$

Somit gilt für die Responsefaktoren (RF = Menge:Fläche) bei gleicher Konzentration (Menge):

$$\frac{RF_X}{RF_Y} = \frac{MG_X}{MG_Y} ; \qquad RF_X = RF_Y \cdot \frac{MG_X}{MG_Y}$$

Mit Hilfe dieser Formel lassen sich Responsefaktoren für Cucurbitacine ausrechnen, die zwar gleiche Chromophoren, aber unterschiedliches Molekulargewicht besitzen. Damit wird eine approximative Bestimmung von Komponenten möglich, die nicht als Reinsubstanz zur Verfügung stehen. Chromatographische Einflüsse auf die Korrekturfaktoren bleiben bei dieser Berechnung unberücksichtigt.

Da uns von Luffae fructus die UV-Spektren aller Peaks vorlagen, konnten wir die nicht identifizierten Peaks einem Cucurbitacintypus und dem entsprechenden Responsefaktor

zuordnen (vgl. Abschnitt II. 2.3.2.3., S. 38). Damit war es möglich, alle Cucurbitacine zu bestimmen und den Gesamtcucurbitacingehalt zu berechnen.

Zur Gehaltsbestimmung wurden handelsübliche Luffaschwämmchen nach dem allgemeinen Extraktionsgang mit Chloroform extrahiert. Der Extrakt wurde nach Zusatz des Inneren Standards auf 100.00 ml eingestellt und chromatographiert (Abb. 28).

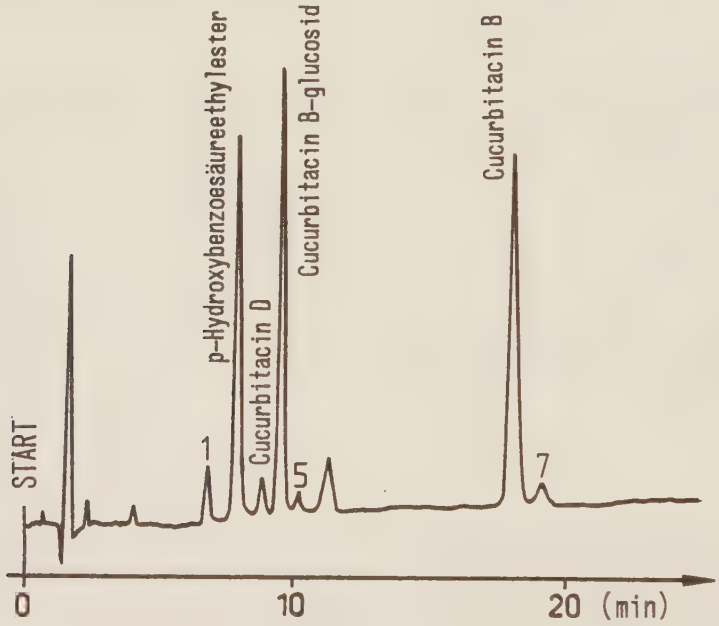


Abb. 28

HPLC-Trennung des Chloroformextraktes von Luffae fructus (TS 7) mit p-Hydroxybenzoesäureethylester als Innerem Standard

Die Ergebnisse der quantitativen Bestimmung sind in Tabelle 6, S. 61, wiedergegeben.

Tabelle 6: Ergebnisse der Gehaltsbestimmung von Luffae fructus

Droge	Einwaage mg	Cu.B mg	Cu.B %	Cu.D mg	Cu.D %	Cu.B-glu. mg	Cu.B-glu. %	Gesamtcu. mg	Gesamtcu. %
Luffa 1	800	15.3	1.9	1.0	0.1	12.1	1.5	32.0	4.0
Luffa 2	1200	21.9	1.8	1.7	0.1	11.1	0.9	38.6	3.2
Luffa 3	520	8.7	1.7	0.8	0.1	11.2	2.1	24.0	4.6

Wir erhielten für Cucurbitacin B einen mittleren Gehalt von 1.8% und für Cucurbitacin D von 0.1%. Die Werte von Cucurbitacin B-glucosid schwankten zwischen 1 und 2%. Der Gesamtcucurbitacingehalt lag zwischen 3 und 4.5% (vom Trockengewicht). Die Konzentrationen von Cucurbitacin B und B-glucosid liegen damit über den von KLOSS (62) angegebenen (1.9% Cucurbitacin B im fermentativ gespaltenen Material). Dafür konnten wir erheblich weniger Cucurbitacin D, als KLOSS (62) angibt (1.8%) nachweisen. Da die Werte von KLOSS nach Isolierung ermittelt wurden, dürfte es sich bei unserer Methode um die exaktere handeln.

Eine mehrmalige Bestimmung der Probe "Luffa 3" ergab für Cucurbitacin B und dessen Glucosid eine relative Standardabweichung von ca. 1%. Der etwas höhere Wert bei Cucurbitacin D (3.95%) ist auf die geringe Substanzmenge zurückzuführen.

Die ausführlichen Meßergebnisse sind in Tab. 7, S. 62, wiedergegeben.

Tabelle 7: Reproduzierbarkeit der Cucurbitacinbestimmung am Beispiel von "Luffa 3" (Mengen in mg)

Best.	Cu. B	Cu. D	Cu. B-glu.	Gesamtcu.
1	8.76	0.75	11.37	24.12
2	8.77	0.82	11.19	24.04
3	8.86	0.81	11.19	24.11
4	8.75	0.79	11.19	24.07
5	8.69	0.83	11.03	23.86
$\bar{x}$	8.77	0.80	11.19	24.04
s^2	0.0038	0.001	0.0145	0.0112
s	0.0612	0.0316	0.1204	0.1056
$\Delta\bar{x}$	0.0274	0.0143	0.0538	0.0472
s_{rel}(%)	0.6778	3.9500	1.0760	0.4393

Damit ist die Reproduzierbarkeit der HPLC-Methode um den Faktor 10 besser als die in-situ Remissionsmessung von MÜLLER (47).

2.8. Untersuchung verschiedener Chargen von Bryoniae radix und Vergleich von Bryonia alba und B.dioica

Unter der Bezeichnung "Bryoniae radix" befinden sich sowohl die Wurzeln von Bryonia alba L. als auch B.dioica JACQ. (= Bryonia cretica L. ssp. dioica (JACQ.)TUTIN) im Handel. Die makroskopische bzw. mikroskopische Unterscheidung der Wurzeln der beiden Arten ist nicht möglich. Eine Identitätsprüfung ist daher nur über die Inhaltsstoffmuster der beiden Drogen zu erreichen.

Bezüglich des Cucurbitacinvorkommens liegen sehr unterschiedliche Angaben vor (vgl. Abschnitt II. 2.3.2.7., S. 44). Bei einem DC-Vergleich fand POHLMANN (72) in beiden Arten das gleiche qualitative Cucurbitacinmuster, wenn unter identischen Bedingungen geerntet, getrocknet und extrahiert wurde.

Um zu überprüfen, ob quantitative Unterschiede bestehen, extrahierten wir verschiedene getrocknete authentische Muster von Bryonia alba und B.dioica unter gleichen Bedingungen (allg. Extraktionsgang), und bestimmten die Cucurbitacine im Chloroformextrakt mittels HPLC. Zusätzlich wurden mehrere Muster von Bryoniae radix Handelsdrogen untersucht.

Die HPLC-Bestimmung erfolgte mit p-Hydroxybenzoesäureethylester als Innerem Standard. Die Eichlösung enthielt die Reinsubstanzen von Cucurbitacin E, I, R, 23,24-Dihydrocucurbitacin B, Cucurbitacin E-glucosid (=Elaterinid) und 23,24-Dihydrocucurbitacin E-glucosid. Der Eichfaktor von Bryoamarid (=Cucurbitacin L-glucosid) wurde aus Acetylbryoamarid (=23,24-Dihydrocucurbitacin E-glucosid) berechnet. Die Bestimmung von Peak I erfolgte unter Bezug auf Bryoamarid, von Peak 5 auf Cucurbitacin I (vgl. Abb. 29, S. 64).

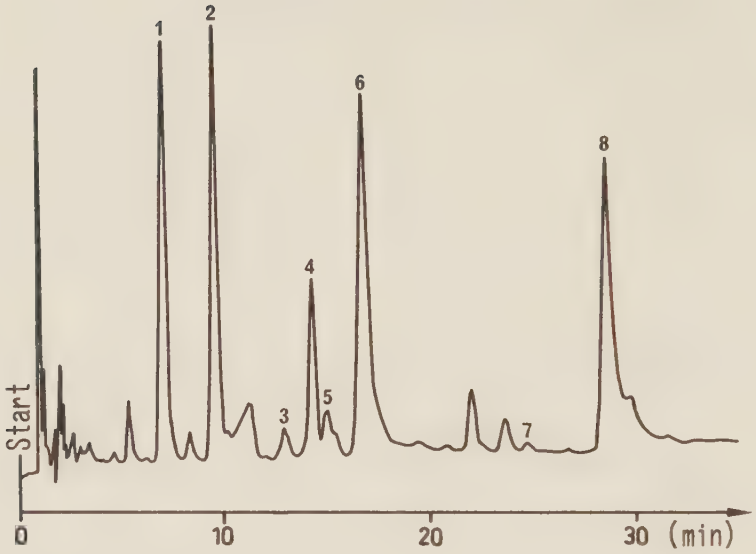


Abb. 29

HPLC-Trennung eines Chloroformextraktes von Bryoniae radix (TS 5) mit p-Hydroxybenzoesäureethylester als Innerem Standard

1 = Cucurbitacin I/L-glucosid
2 = p-Hydroxybenzoesäureethylester
3 = Cucurbitacin R
4 = Cucurbitacin E-glucosid
5 = 23,24-Dihydrocucurbitacin E-glucosid
6 = Cucurbitacin I/L
7 = 23,24-Dihydrocucurbitacin B
8 = Cucurbitacin E

Die Diosphenolcucurbitacine wurden im System 25% Acetonitril $\xrightarrow{30'}$ 45% Acetonitril unter Zusatz von 1% Essigsäure (TS 8) getrennt und bei 270 nm detektiert. Durch die Essigsäure konnte das Tailing der Aglykone zurückgedrängt und die Integration der Peaks verbessert werden. Die Tetrahydrocucurbitacine wurden ohne Säurezusatz bei 230 nm bestimmt (TS 5). In diesem Trennsystem würden sich auch alle Cucurbitacine gleichzeitig bestimmen lassen.

Die Ergebnisse sind in Tab. 8, S. 67 und in Abb. 30, S. 66, wiedergegeben. Es ist deutlich zu erkennen, daß der Gehalt der einzelnen Cucurbitacine in den verschiedenen Chargen großen Schwankungen unterworfen ist. Der Gesamtcucurbitacingehalt (= Summe der Einzelgehalte) bewegt sich zwischen 0.01 und 0.81%. Entsprechend groß ist auch die Schwankungsbreite innerhalb der authentischen B.alba und B.dioica-Wurzeln, so daß wir mit dem uns vorgelegenen Material keine endgültigen Unterscheidungskriterien für die beiden Arten aufstellen können.

Einziges feststellbares Merkmal scheint zu sein, daß B.alba-Wurzeln allgemein einen geringeren Gehalt aufweisen, als die B.dioica-Wurzeln. Diese Feststellung deckt sich in gewisser Weise mit den Angaben von RIPPERGER (50), der in B.alba keine Cucurbitacine nachweisen konnte.

Die Schwankungsbreite der Gehalte der Handelsdrogen macht deutlich, wie wichtig die Standardisierung dieser Drogen ist. Die beschriebene HPLC-Methode erscheint uns hierzu am besten geeignet.

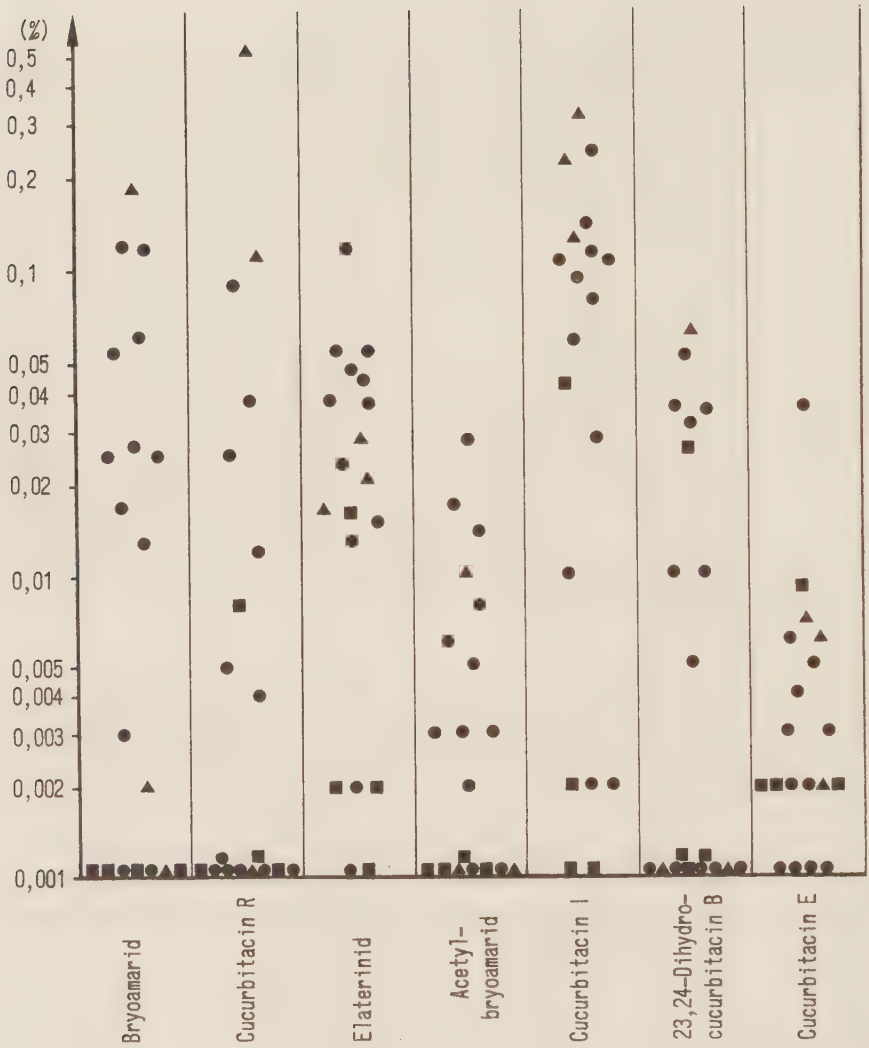


Abb. 30

Die Schwankungsbreite im Cucurbitacingehalt der untersuchten Bryoniae radix-Chargen (Konzentration in logarithmischer Auftrageweise; die Werte ≤ 0.001% wurden bei 0.001% eingetragen)

● = Bryonia-Art unbekannt oder zweifelhaft
■ = Bryonia alba
▲ = Bryonia dioica

Tabelle 8: Cucurbitacingehalt in den untersuchten Bryoniae radix Chargen+) in % vom Trockengewicht

Nr.	Bryonia-Art	Bryoamarid	Cucurb. R	Elaterinid	Acetyl-bryoamarid	Cucurb. I	23,24-Dihydrocucurb. B	Cucurb. E	gesamt
1	unbek.	0.055	-	0.047	0.014	0.105	0.035	0.003	0.259
2	unbek.	0.062	0.025	0.013	0.001	0.058	0.010	0.001	0.170
3	B.alba(?)	0.013	-	0.023	0.006	0.028	0.031	0.002	0.103
4	unbek.	0.027	0.005	0.117	0.028	0.112	0.005	0.004	0.298
5	B.alba(?)	0.003	-	0.038	0.002	0.010	0.051	0.003	0.104
6	B.alba	0.001	-	0.016	-	0.042	0.026	0.009	0.094
7	unbek.	-	-	0.001	0.003	0.002	0.034	-	0.040
8	unbek.	-	-	0.002	0.003	0.002	-	-	0.007
9	B.dioica	0.182	-	0.028	0.010	0.301	-	0.002	0.523
10	unbek.	0.017	0.089	0.015	-	0.105	-	0.001	0.227
11	unbek.	0.025	-	0.055	0.003	0.091	-	0.005	0.179
12	unbek.	0.025	0.004	0.055	0.008	0.079	-	0.006	0.177
13	B.dioica	0.002	0.503	0.021	-	0.218	0.063	0.007	0.814
14	B.dioica	-	0.110	0.016	-	0.123	-	0.006	0.255
15	B.alba(?)	0.120	0.012	0.037	0.017	0.240	-	0.002	0.428
16	B.alba(?)	0.118	0.038	0.044	0.005	0.138	0.010	0.035	0.388
17	B.alba	-	0.008	0.001	-	0.001	-	0.002	0.011
18	B.alba	-	-	0.002	-	0.002	-	0.002	0.006
19	B.alba	-	-	0.002	-	0.001	-	0.002	0.005

+) Herkunft der einzelnen Chargen siehe Exp.Teil, Tab. 15, S. 156

3. Diskussion der in Kapitel 1 erhaltenen Ergebnisse

Durch das von uns entwickelte HPLC-Trennsystem ist es möglich, die meisten Cucurbitacine und Cucurbitacinglykoside in einem Analysengang zu trennen. Durch die Detektion bei 230 nm erhält man eine Empfindlichkeit, die mit der Nachweisgrenze bei der DC vergleichbar ist. Die Trennleistung der HPLC ist aber insgesamt größer und die Peaks sind besser auswertbar. Die Trennung der auch mit DC schwer trennbaren Cucurbitacinpaare I und L, sowie I- und L-glucosid war nicht möglich.

Während die einzelnen Cucurbitacine auf der DC nach Detektion mit Vanillin/Phosphorsäure, Triphenyltetrazoliumchlorid und Eisen-III-chlorid durch ihre unterschiedliche Färbung differenzierbar sind, gelingt dies bei der HPLC nur durch den Einsatz der Photodiodenarray-Technik. Diese neue Detektionsmethode erlaubt eine wesentlich schnellere und sicherere Peakidentifizierung über die kontinuierlich aufgenommenen UV-Spektren.

Mit dieser HPLC-Methode kann für cucurbitacinhaltige Drogen ein charakteristischer Cucurbitacinfingerprint erhalten und damit eine Identitäts- und Qualitätsprüfung durchgeführt werden. Da sich die Retentionsbereiche von Flavonoiden und Cucurbitacinen überlappen, ist zur sicheren Identifizierung der Cucurbitacine ebenfalls die Photodiodenarray-Technik heranzuziehen.

Wie bei Bryoniae radix demonstriert werden konnte, hat beim Vorliegen von glykosidspaltenden Enzymen die Extraktionsart wesentlichen Einfluß, ob und inwieweit das genuine Cucurbitacinglykosidmuster erhalten bleibt. Die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln führt in jedem Falle zur Inaktivierung der Enzyme und damit zu einem glykosidhaltigen Extrakt. Aber auch bei der Trocknung der Droge wird ein Teil der Glykoside hydrolysiert, so daß dann Glykoside und Aglykone nebeneinander vorliegen können.

Mit Hilfe der HPLC-Methode konnte auch bei einem homöopathischen Mischpräparat das für Colocynthidis fructus typische Cucurbitacinmuster erhalten werden. Prinzipiell sind also auch Homöopathika mit dieser Methode analysierbar. Am Beispiel von zwei anderen Präparaten konnte wiederum gezeigt werden, daß nur durch eine Peakidentifizierung mit der Photodiodenarray-Technik die Fehlinterpretation von Peaks bzw. Chromatogrammen vermieden wird, da auch Anthraglykoside in dem verwendeten HPLC-System ähnliches Retentionsverhalten zeigen wie Cucurbitacine.

Bei der Untersuchung von homöopathischen Urtinkturen waren die Cucurbitacine nur in Tinkturen von "Colocynthis", "Luffa" und "Iberis amara" ohne Anreicherung nachweisbar. Bei "Colocynthis" konnten sie sogar noch in der Verdünnung D3 direkt mit HPLC nachgewiesen werden. Die Tatsache, daß bei den übrigen Urtinkturen die Cucurbitacine nicht oder nur in Spuren zu finden waren, führen wir auf die Extraktionsweise mit wasserhaltigem Ethanol zurück. Nur bei der Extraktion mit mindestens 90%igem Ethanol werden die Cucurbitacine annähernd quantitativ erfaßt.

Die Übertragung der Cucurbitacin-HPLC-Trennung in den semipräparativen Maßstab ist ohne Probleme möglich. Die Isolierung von Mengen bis zu 10 mg erfordert bei einfach zusammengesetzten Extrakten (z.B. Colocynthidis fructus) nur geringen Zeitaufwand. Dabei entfällt bei der Verwendung von C18-Umkehrphasen als stationärer Phase der negative Einfluß von Kieselgel, das lt. KUPCHAN (86) zur Bildung von Isocucurbitacinen führt.

Die quantitative Bestimmung der Cucurbitacine durch HPLC ist, wie am Beispiel von Luffae fructus gezeigt werden konnte, ohne Schwierigkeiten möglich. Sie kann durch Verwendung der Methode des Externen oder Internen Standards erfolgen. Die Korrekturfaktoren sind innerhalb eines Cucurbitacintyps (gleiches UV-Spektrum) annähernd gleich, so daß von jedem Typus nur eine Vergleichssubstanz zur Verfügung stehen muß.

Die HPLC-Methode arbeitet bei Verwendung eines Inneren Standards mit einer relativen Standardabweichung von ca. 1% und ist damit wesentlich genauer als die von MÜLLER (47) und VAN KEULEN (46) beschriebenen DC-Methoden.

Für Luffae fructus konnten wir einen Gesamtcucurbitacingehalt von 3 - 4.5% bestimmen. Der erstmals ermittelte Gehalt von Cucurbitacin B-glucosid liegt zwischen 1 und 2% und ist damit etwa gleich hoch wie der des entsprechenden Aglykons. Cucurbitacin D lag in den von uns untersuchten Proben nur in geringer Menge vor (0.1%).

Der Vergleich von verschiedenen Bryoniae radix-Chargen ergab eine große Schwankungsbreite sowohl beim Gesamtgehalt an Cucurbitacinen (0.01 bis 0.81%) als auch beim Gehalt der einzelnen Cucurbitacine. Bryonia alba ließ sich diesbezüglich von Bryonia dioica nur dadurch unterscheiden, daß die untersuchten Muster von B.alba einen sehr geringen Gehalt aufwiesen. Inwieweit diese Ergebnisse durch eine unterschiedliche Lagerung bzw. verschiedene Erntezeitpunkte bedingt sind, läßt sich bei den Handelsdrogen nachträglich nicht mehr sagen. Die festgestellten Gehaltsschwankungen machen eine Standardisierung unumgänglich.

Kapitel 2:

Isolierung der Inhaltsstoffe von Cayaponia tayuya (VELL.)COGN.

I. Vorkommen und botanische Beschreibung von Cayaponia tayuya

1. Systematik und Verbreitung

Cayaponia tayuya (VELL.)COGN.+) gehört zur Familie der Cucurbitaceen, die nach LEMEE (87) 112 Genera und 5 Tribus umfaßt. Die Gattung Cayaponia MANSO ordnet er dem Tribus Cucurbiteae und dem Subtribus Abobrinae PAX zu. Nach JEFFREY (88) ist diese Gattung eine der größten innerhalb der Cucurbitaceen. Sie wird von ihm in die zwei Untergattungen Cayaponia und Trianosperma (TORR. & GRAY) COGN. unterteilt. Cayaponia tayuya zählt lt. JEFFREY (88) zur ersteren.

Die Pflanze ist in Südamerika (Brasilien) heimisch und führt die synonymen Bezeichnungen Trianosperma piauhiensis COGN., Cayaponia piauhiensis COGN., Trianosperma tayuya MART., Bryonia tayuya VELL., Bryonia cordatifolia und Alternasennica tayuya MANSO (8,9,88,89).

2. Botanische Beschreibung der Pflanze

Nach PECKOLT (90) hat die Pflanze langgestielte, große, tief drei- bis fünflappige steifhaarige Blätter. Die monözischen Blüten sind klein und gelbgrünlich, die beerenartigen Früchte eiförmig und rot glänzend, 15 mm lang und 9 mm dick.

+) Im HAGER (9) und in verschiedenen anderen Literaturstellen fälschlicherweise mit Cayaponia tayuya (MART.) LOGNIAUX bezeichnet.

Abb. 31

Habituszeichnung von Cayaponia tayuya (VELL.)COGN. (syn.Bryonia tayuya VELL.) aus Vellozo, Florae Fluminensis X, tab.89 (1835)

Der knollige Wurzelstock hat fleischige, rübenähnliche, gelbbraune Wurzeln von "ekelerregendem Geschmack und üblem Geruch", welcher beim Trocknen verschwindet (90).

Die exakte botanische Beschreibung findet sich in MARTIUS' Flora Brasiliensis (89).

Das Pulver der in länglichen, 0.5 bis 1 cm breiten, faserigen Stücken in den Handel kommenden getrockneten Wurzel ist durch viele dünnwandige Parenchymfetzen, sowie durch charakteristische Netz- und Tüpfelgefäße, die sich mit Phloroglucin/Salzsäure violett anfärben lassen, gekennzeichnet.

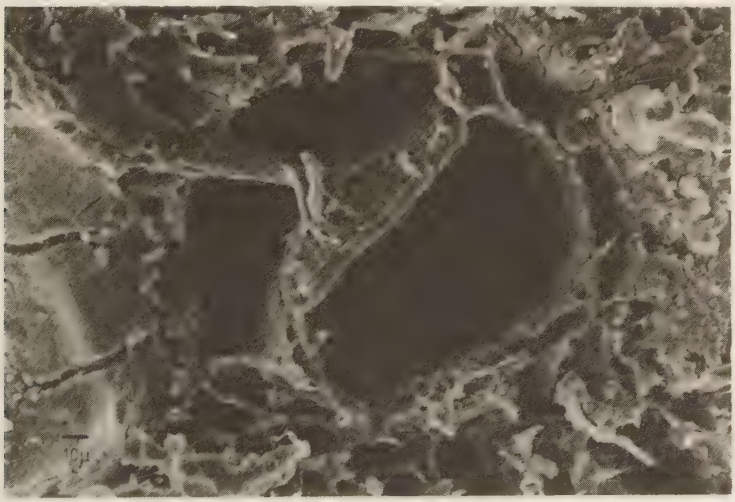


Abb. 32

Querschnitt durch Tüpfelgefäß
(REM-Aufnahme; 400fache Vergrößerung)

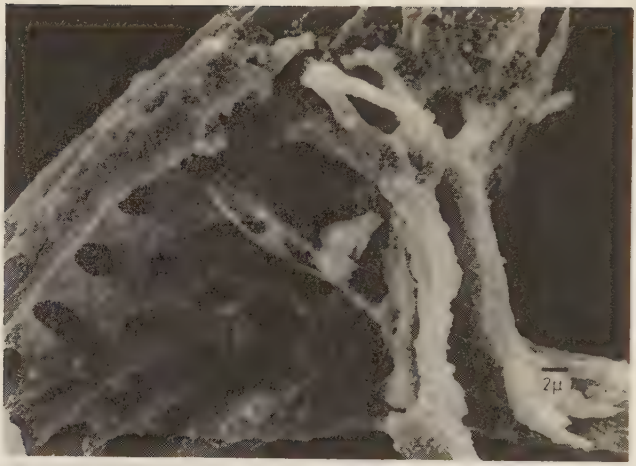


Abb. 33
Tüpfelgefäß
(REM-Aufnahme; 2000fache Vergrößerung)

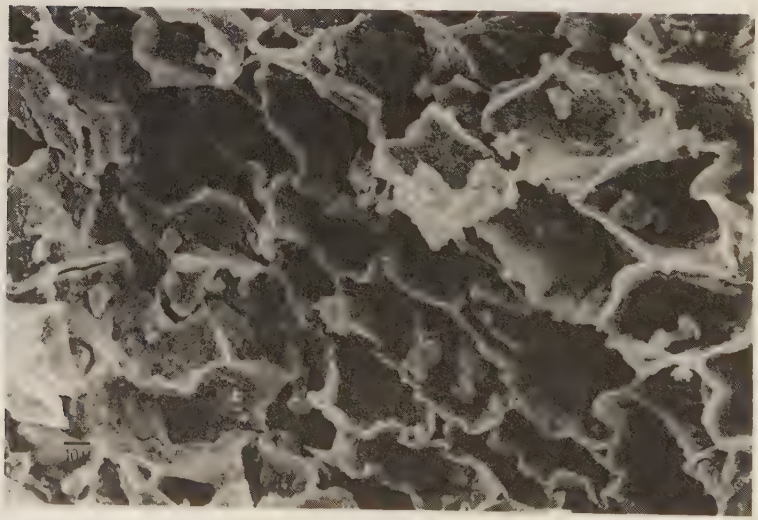


Abb. 34
Parenchymatische Zellen
(REM-Aufnahme; 400fache Vergrößerung)

II. Verwendung in der Volksmedizin

Cayaponia tayuya wird vor allem in Brasilien, neben anderen Cucurbitaceen der Gattungen Cayaponia, Trianosperma und Bryonia, unter der indianischen Bezeichnung "Tayuya" medizinisch verwendet (91). Für Cayaponia tayuya (=Trianosperma tayuya) existieren dabei auch noch die Bezeichnungen "Tayuya de fruta incarnada" (T. mit roten Früchten), "Abobrinha do mato" (Kleiner Waldkürbis), "Cabeca de negro" (Negerkopf), "Cabeca de mouleque" (Negerknabenkopf) und "Tejuco" (90).

Die Wurzel wird in der Volksmedizin u.a. als Purgans, Emetikum, Diuretikum und Depurativum, sowie bei Gicht, Rheuma und Ischias angewendet (6,91,92).

III. Bisher bekannte Inhaltsstoffe

Über die Inhaltsstoffe von Cayaponia tayuya (VELL.)COGN. liegen kaum Untersuchungen vor. Aus den frischen Wurzeln wurden lediglich von FREISE (93) 0.8 bis 0.95% ätherisches Öl isoliert.

Andere Cayaponia- bzw. Trianosperma-Arten sind bisher auch nur sehr spärlich untersucht worden. EARLE (94) fand im fetten Samenöl einer nicht näher definierten Cayaponia-Art mehrfach-ungesättigte Fettsäuren. HOPKINS und Mitarb. (95, 96) konnten im Samenöl von Cayaponia grandifolia (T.u.G.) SMALL. und Cayaponia africana (HOOK.f.)EXELL. Punicinsäure, eine cis,trans,cis-9,11,13-Octadecatriensäure, nachweisen.

In den frühen Arbeiten von PECKOLT (90,97) wird von "kristallinen Bitterstoffen" berichtet, die aus Cayaponia diversifolia, C.espelina, C.cabloca und C.martiana isoliert worden waren. "Cayaponin", aus C.cabloca, zeigte dabei ähnliche Eigenschaften wie "Elaterin" aus Ecballium elaterium, womit die Anwesenheit von Cucurbitacinen angezeigt wurde.

PECKOLT (90,97) berichtet außerdem von "Alkaloiden" in verschiedenen Cayaponia-Arten, die aber chemisch nicht näher definiert wurden. Nach HEGNAUER (98,99) könnte es sich dabei um Aminosäuren gehandelt haben.

Über das Vorkommen von Flavonoiden in der Gattung Cayaponia lagen bisher noch keine Untersuchungen vor.

IV. Isolierung der Cucurbitacine aus der Wurzel von Cayaponia tayuya (VELL.)COGN.

1. Extraktion der Droge

Für die Isolierung der Cucurbitacine aus der Wurzel von Cayaponia tayuya (VELL.)COGN. wurde die pulverisierte Droge am Soxhlet mit n-Hexan entfettet und anschließend erschöpfend mit Chloroform extrahiert. Wir erhielten in 2.3%iger Ausbeute einen gelben harzartigen "Chloroformextrakt", der für die weiteren Untersuchungen verwendet wurde.

2. Voruntersuchungen

2.1. Dünnschichtchromatographie

Der Chloroformextrakt wurde zunächst dünnschichtchromatographisch im System Chloroform-Methanol (9:1) auf Cucurbitacine untersucht. Die Detektion erfolgte mit Vanillin/Phosphorsäure, Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) und Eisen-III-chlorid-Lösung.

Mit Vanillin/Phosphorsäure traten vorwiegend gelb fluoreszierende Zonen auf (vgl. Abb. 35, S. 78). Nach der im Kapitel 1 gegebenen Übersicht waren somit vorwiegend 23,24-Dihydrocucurbitacine zu erwarten. Dabei handelte es sich bei den beiden Hauptzonen im oberen R_f-Bereich vermutlich um Aglykone, und bei den unteren Zonen um Glykoside. Die zwei blau angefärbten Zonen bei R_f 0.05 und 0.15 konnten als Flavonoide erkannt werden, wobei es sich bei der unteren Zone um Swertisin handelt (siehe auch Abschnitt V, S. 105). Die Rotfärbung der Aglykonzonen nach Detektion mit TTC ließ vermuten, daß α-Ketolcucurbitacine vorliegen. Da sich die beiden unteren Zonen nicht mit TTC anfärbten, sollte es sich hier um entsprechende Glykoside handeln, da bei einer 2-O-Zuckerverknüpfung keine Oxidation zum

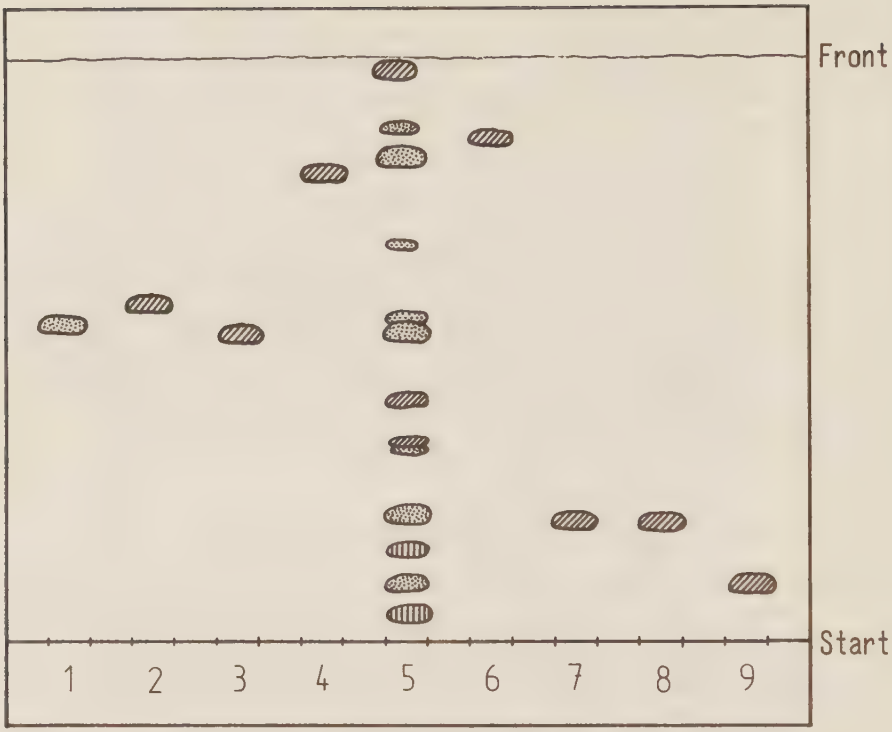


Abb. 35

DC-Trennung des Chloroformextraktes von Tayuyae radix und verschiedener Cucurbitacin-Referenzsubstanzen

LM: Chloroform-Methanol 9:1

Detektion: Vanillin/Phosphorsäure

= gelb fluoreszierend im UV 365 nm

= rot fluoreszierend im UV 365 nm

= blau fluoreszierend im UV 365 nm

1 = Cucurbitacin L
2 = Cucurbitacin I
3 = Cucurbitacin D
4 = Cucurbitacin B
5 = Chloroformextrakt von Tayuyae radix
6 = Cucurbitacin E
7 = Cucurbitacin B-glucosid
8 = Cucurbitacin E-glucosid
9 = Cucurbitacin I-glucosid

Diosphenol eintritt. Der negative Ausfall der Eisen-III-chlorid-Reaktion sprach für die Abwesenheit von Diosphenolcucurbitacinen bzw. phenolischen Verbindungen. Die äußerst schwache Fluoreszenzminderung aller Zonen deutete auf Cucurbitacine ohne α,β-ungesättigte Carbonylgruppen (1,2,23,24-Tetrahydrocucurbitacine) hin.

Die mitchromatographierten Vergleichssubstanzen konnten in Cayaponia tayuya nicht nachgewiesen werden.

2.2. Hochleistungsflüssigchromatographie

Die HPLC des Chloroformextraktes erfolgte in dem bereits in Kapitel 1 beschriebenen System TS 1 und in einem zweiten, optimierten System (TS 5), das kürzere Trennzeiten ermöglichte.

Die Hauptpeaks wurden zunächst im µg-Maßstab isoliert und den entsprechenden Zonen der DC zugeordnet. Es zeigte sich, daß erst die zwei Flavonoide abgetrennt, und dann die Cucurbitacine Glykosid 1, Aglykon 1, Glykosid 2 und Aglykon 2 eluiert werden (vgl. Abb. 36, S. 80). Die Elutionsreihenfolge der HPLC und der DC stimmen also nicht überein.

Weitere Hinweise über die Zusammensetzung des Chloroformextraktes erhielten wir durch Vergleich der Chromatogramme, aufgenommen bei verschiedenen Wellenlängen (340 nm, 270 nm, 230 nm und 200 nm), wie dies mit Hilfe des HP 1040A-Photodiodenarray-Detektors möglich ist (vgl. Abb. 37, S. 81). Es ist deutlich zu erkennen, daß Verbindungen, die bei 340 nm absorbieren, innerhalb der ersten 10 Minuten eluiert werden. Die später aufgenommenen UV-Spektren zeigten, daß es sich hierbei um Flavone handelte. Als ideale Detektionswellenlänge zur Erfassung der Cucurbitacine erwies sich 230 nm, da bei 270 nm die Nachweisempfindlichkeit zu gering ist, bei 200 nm aber auch mehrere Verbindungen mit reiner UV-Endabsorption erscheinen.

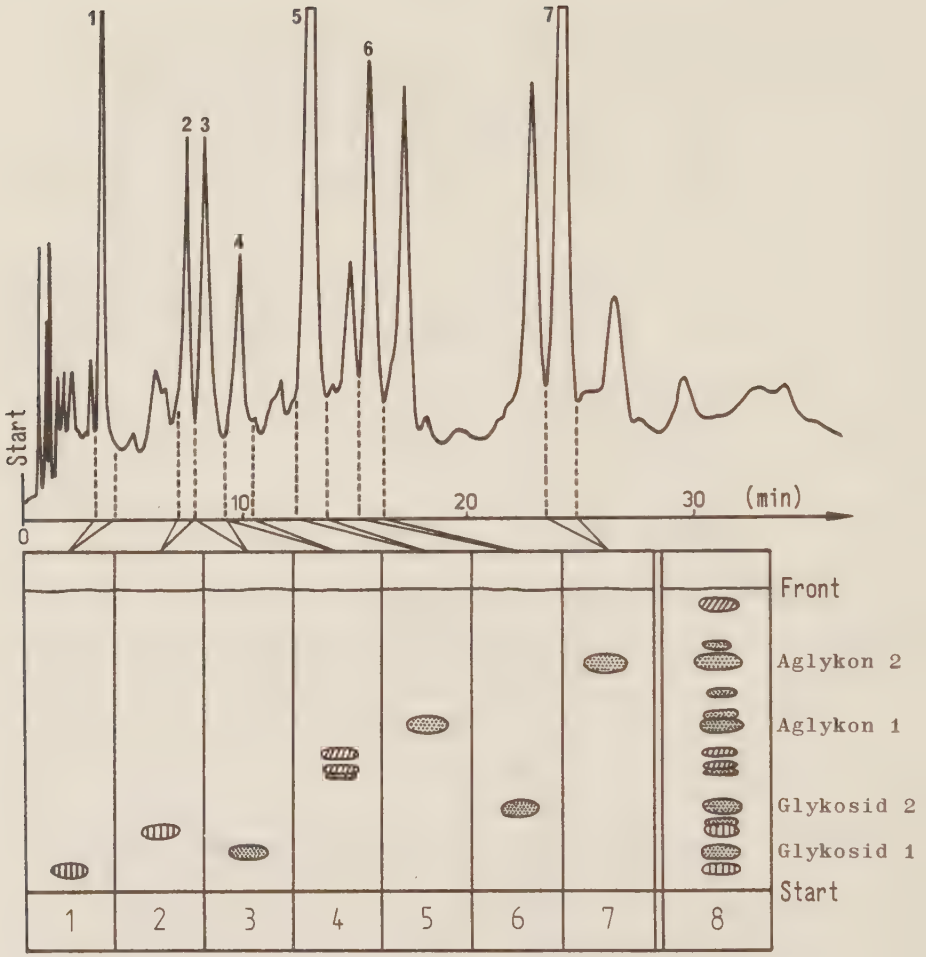


Abb. 36

HPLC-Trennung des Chloroformextraktes von Tayuyae radix und Zuordnung der DC-Zonen

HPLC: TS 5 (vgl.Exp.Teil)

DC: LM: Chloroform-Methanol 9:1
Det.: Vanillin/Phosphorsäure

= rot im UV 365 nm
= gelb im UV 365 nm
= blau im UV 365 nm

1 = Flavonoid 1 (C.t.I)
2 = Flavonoid 2 (C.t.III)
3 = Glykosid 1 (C.t.IV)
4 = nicht identifiziert
5 = Aglykon 1 (C.t.V)
6 = Glykosid 2 (C.t.VI)
7 = Aglykon 2 (C.t.X)
8 = Chloroformextrakt von Tayuyae radix

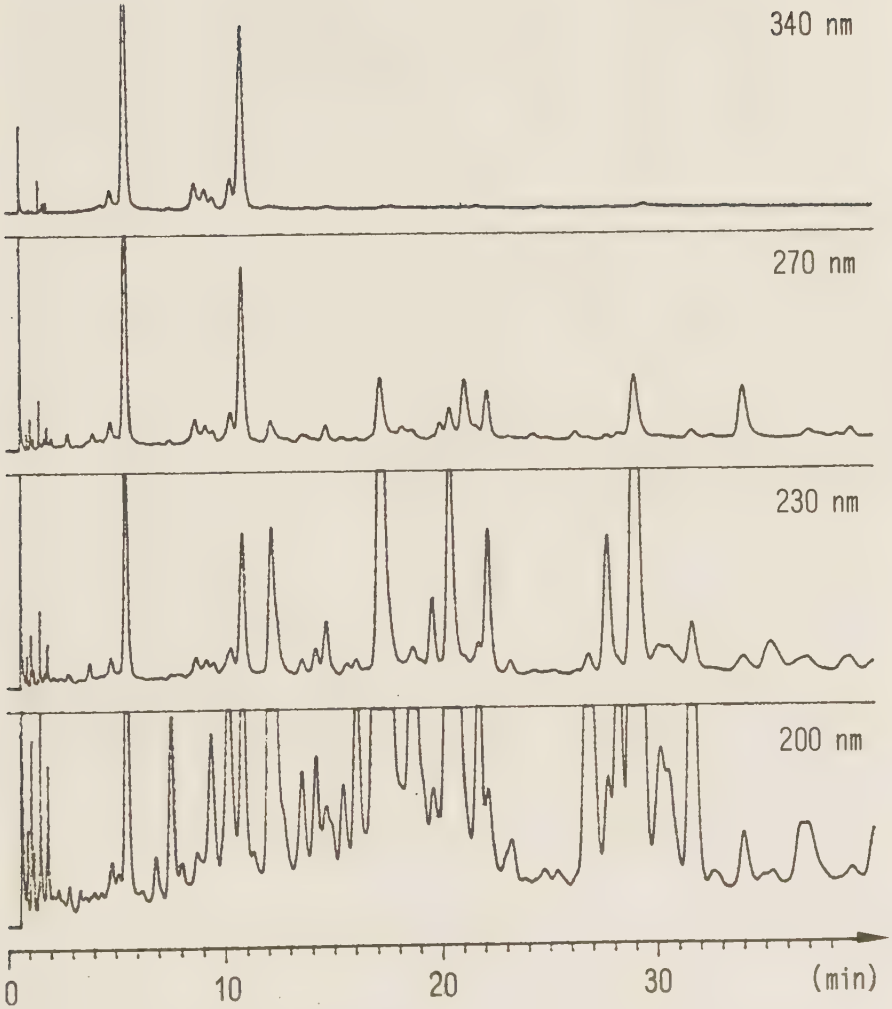


Abb. 37

HPLC-Trennung des Chloroformextraktes von Tayuyae radix (TS 1; vgl.Exp.Teil), simultan bei verschiedenen Wellenlängen detektiert

2.3. UV-Spektren

Die UV-Spektren, die mit Hilfe der Photodiodenarray-Technik aufgenommen wurden, gaben Hinweis auf den Strukturtyp der Cucurbitacine und erlaubten Nicht-Cucurbitacine zu erkennen (vgl. Kapitel 1). Durch die Aufnahme je eines Spektrums an der Anstiegsflanke, der Spitze und der Abstiegsflanke konnte der Reinheitsgrad der einzelnen Peaks ermittelt werden.

Abb. 38, S. 83, gibt die UV-Spektren von 18 Komponenten des Chloroformextraktes wieder. Sie machen deutlich, daß verschiedene Strukturtypen vorliegen. Peak 1 und Peak 5 geben ein typisches Flavonspektrum. Die Substanzen 2, 3, 4, 7, 9, 14 und 16 zeigen nur Endabsorption. Bei diesen könnte es sich entweder um Sterine oder um Cucurbitacine ohne konjugierte Doppelbindungen handeln. Die Peaks Nr. 6 (= Glykosid 1), Nr. 8 (= Aglykon 1), Nr. 11 (= Glykosid 2), Nr. 12, Nr. 17 (= Aglykon 2), Nr. 18, Nr. 19 und Nr. 20 sind nach dem UV-Spektrum der Gruppe der 1,2,23,24-Tetrahydrocucurbitacine zuzuordnen. Peak 10 und 15 besitzen ein UV-Absorptionsmaximum bei 230 nm, so daß vermutlich α-Ketol-Cucurbitacine mit ungesättigter Seitenkette vorliegen. Das UV-Spektrum von Peak 13 konnte nicht zugeordnet werden. Es handelt sich vermutlich um eine Komponente mit α,β-ungesättigter Carbonylgruppe. Das gleiche Spektrum weist auch Peak Nr. 21 auf.

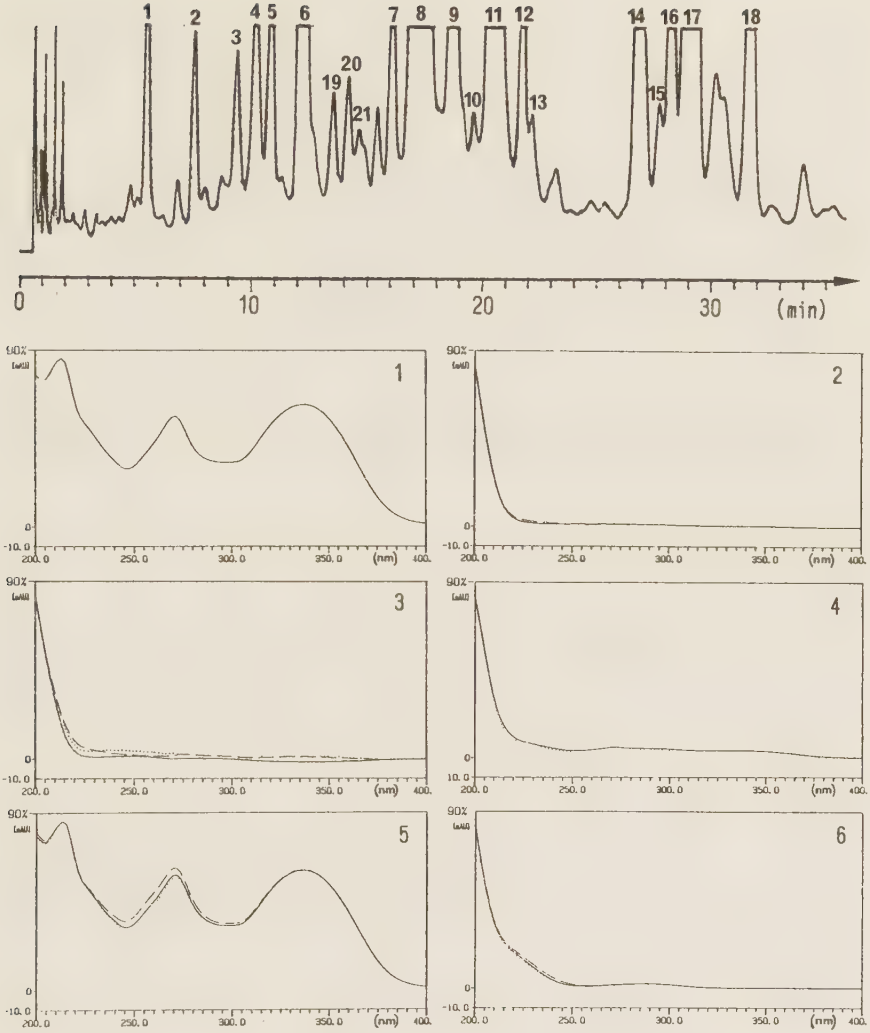
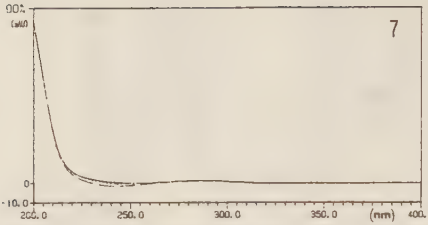


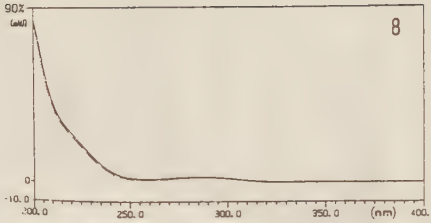
Abb. 38

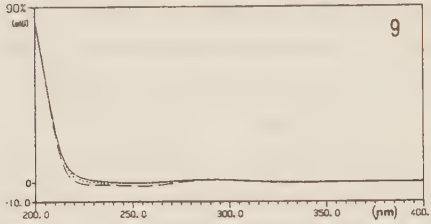
UV-Spektren der Hauptkomponenten des Chloroformextraktes von Tayuyae radix, on line aufgenommen mit dem HP 1040A-Photodiodenarray-Detektor (HPLC-Trennung: TS 1; 200 nm). Als Referenzspektrum dient jeweils das vor der Elution des Peaks aufgenommene Spektrum.

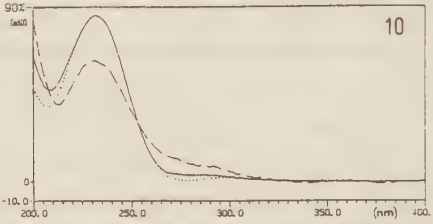
..... Spektrum in der Anstiegsflanke
———— Spektrum an der Peakspitze
---------- Spektrum in der Abstiegsflanke

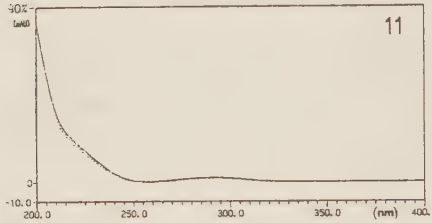
Fortsetzung Seite 84 ⟶

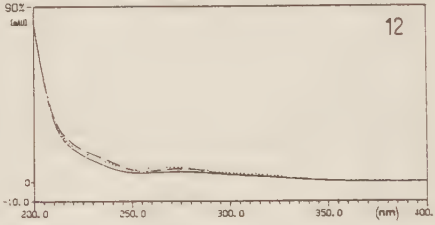

90%
0
-10.0
200.0
250.0
300.0
350.0
(nm)
400.
7

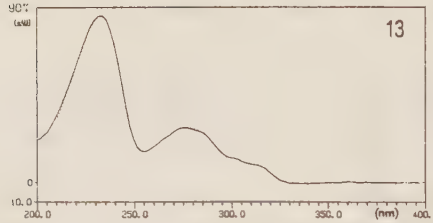

90%
0
-10.0
200.0
250.0
300.0
350.0
(nm)
400.
8

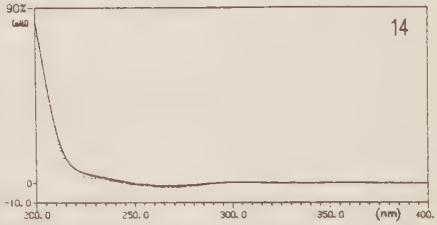

90%
0
-10.0
200.0
250.0
300.0
350.0
(nm)
400.
9

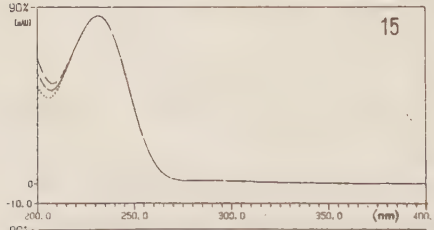

90%
0
-10.0
200.0
250.0
300.0
350.0
(nm)
400.
10

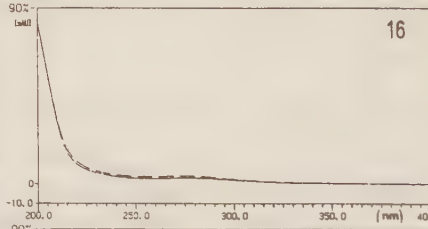

90%
0
-10.0
200.0
250.0
300.0
350.0
(nm)
400.
11

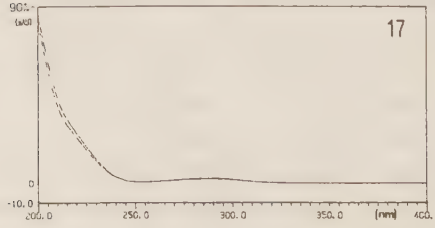

90%
0
-10.0
200.0
250.0
300.0
350.0
(nm)
400.
12

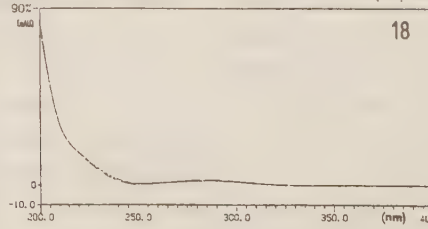

90%
0
-10.0
200.0
250.0
300.0
350.0
(nm)
400.
13


90%
0
-10.0
200.0
250.0
300.0
350.0
(nm)
400.
14


90%
0
-10.0
200.0
250.0
300.0
350.0
(nm)
400.
15


90%
0
-10.0
200.0
250.0
300.0
350.0
(nm)
400.
16


90%
0
-10.0
200.0
250.0
300.0
350.0
(nm)
400.
17


90%
0
-10.0
200.0
250.0
300.0
350.0
(nm)
400.
18

2.4. Hydrolyseversuche

Zur sicheren Zuordnung der Glykoside und Aglykone unterzogen wir den Chloroformextrakt von Tayuyae radix einer Hydrolyse. Die Ansätze mit 2N-Trifluoressigsäure bzw. 0.5N Schwefelsäure brachten keine befriedigenden Ergebnisse. Nach Trifluoressigsäurehydrolyse konnte das entstandene "Aglykon" im ursprünglichen Chloroformextrakt nicht wiedergefunden werden. Die Hydrolyse mit Schwefelsäure erfolgte dagegen nicht quantitativ, wobei aber dasselbe "Aglykon" wie bei der Trifluoressigsäure-Hydrolyse auftrat. Abb. 39, S. 86, zeigt die Ergebnisse der beiden Hydrolysen. Vermutlich handelt es sich bei dem "Aglykon" um ein Artefakt. Der bei der Hydrolyse freigesetzte Zucker konnte dünnschichtchromatographisch als D-Glucose identifiziert werden.

Wegen der offensichtlichen Empfindlichkeit der Aglykone gegenüber Säuren führten wir enzymatische Hydrolysen mit α- und β-Glucosidase durch, allerdings ohne greifbares Resultat. Bereits MÜLLER und AUTERHOFF (100) hatten beobachtet, daß β-Glucosidase gegenüber Cucurbitacinglykosiden nur eine geringe Aktivität aufweist. Die besten Ergebnisse erhielten sie mit Cellulase und β-Glucuronidase.

Ein Ansatz mit Cellulase brachte auch in unserem Fall das beste Resultat. In Abb. 40, S. 87, sind die Hydrolyseergebnisse chromatographisch wiedergegeben.

Es zeigte sich eindeutig, daß es sich bei dem nach Säurehydrolyse auftretenden Aglykon um ein Artefakt handelt, und daß die Aglykone 1 und 2 vermutlich direkt von den Glykosiden 1 und 2 stammen.

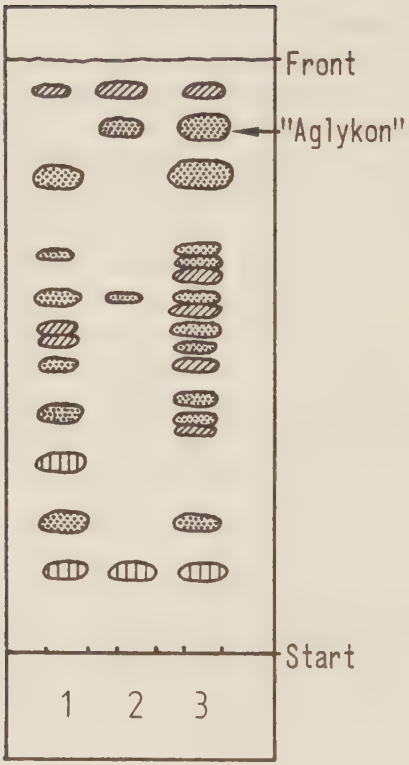


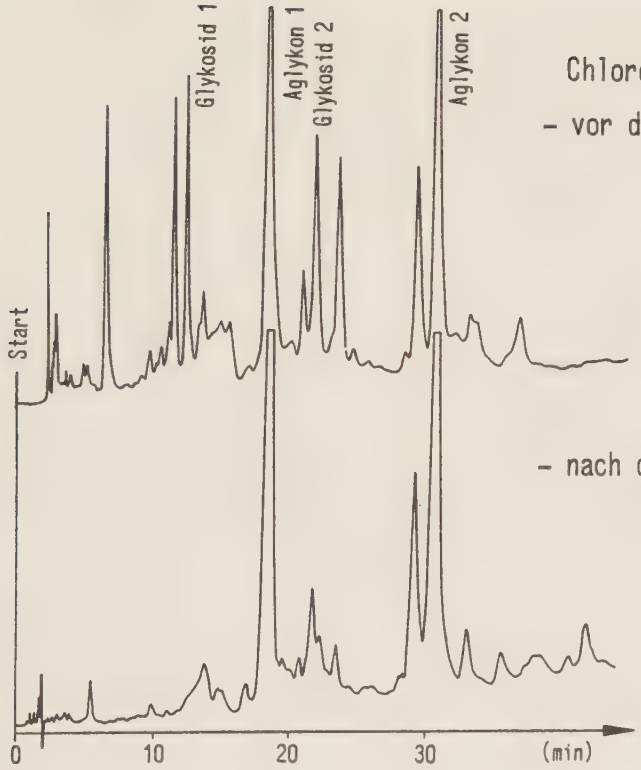
Abb. 39

Ergebnisse der Säurehydrolyse des Chloroformextraktes von Tayuyae radix

LM: Chloroform-Methanol 9:1
Det.: Vanillin/Phosphorsäure

= rot im UV 365 nm
= gelb im UV 365 nm
= blau im UV 365 nm

1 = Chloroformextrakt von Tayuyae radix
2 = nach Trifluoressigsäurehydrolyse
3 = nach Schwefelsäurehydrolyse



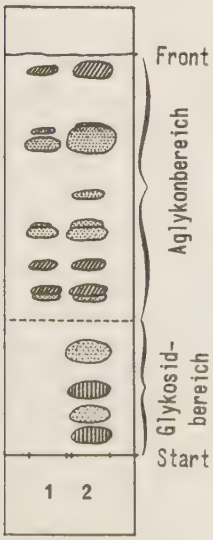


Abb. 40

Chromatographischer Vergleich des Chloroformextraktes von Tayuyae radix, vor und nach der Hydrolyse mit Cellulase

HPLC: TS 1 (siehe Exp.Teil)

DC: LM: Chloroform-Methanol 9:1
Detektion: Vanillin/Phosphorsäure

= rot im UV 365 nm
= gelb im UV 365 nm
= blau im UV 365 nm

1 = Chloroformextrakt von Tayuyae radix nach der Hydrolyse mit Cellulase

2 = Chloroformextrakt vor der Hydrolyse

3. Isolierung der Cucurbitacine mittels HPLC

Da in der Literatur bereits mehrfach über die Bildung von Artefakten während der Isolierung von Cucurbitacinen berichtet worden war (86,101), vermieden wir Kieselgel als stationäre Phase. Außerdem sollten im gleichen Trennungsgang sowohl die Aglykone als auch die Glykoside isoliert werden.

Ausgehend von der analytischen Trennung verwendeten wir für die präparative HPLC eine C18-Umkehrphase. Der Chloroformextrakt wurde zunächst an einer präparativen Säule (55 x 2.5 cm Stahlsäule, gefüllt mit C18-Material aus einer PrepPak^{R}C18-Kartusche) vorgetrennt. Durch den relativ großen Teilchendurchmesser der stationären Phase (60 µm) waren zwar hohe Durchflußraten (20 ml/min) bei tolerierbarem Arbeitsdruck möglich, doch reichte die Trennleistung nicht an die von analytischen Säulen mit 5 µm bzw. 10 µm Teilchen heran. Wir konnten daher zunächst nur mit Cucurbitacinen angereicherte Fraktionen erhalten, die einen engen Polaritätsbereich aufwiesen, so daß eine spätere Reinigung unter isokratischen Bedingungen möglich wurde. Von verschiedenen getesteten Laufmittelsystemen erwies sich ein mehrstufiger Gradient (siehe Abb. 41, S. 89) von 50% Methanol auf 80% Methanol bei einem Durchfluß von 20 ml/min als optimal. Es wurde in vier Fraktionen geschnitten.

Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch und mit HPLC überprüft und anschließend mit Hilfe einer semipräparativen Säule (7.9 x 300 mm, µ-Bondapak^{R}C18) in die einzelnen Komponenten getrennt.

Fraktion I konnte in isokratischer Arbeitsweise (57.5% Methanol) in die Verbindungen C.t. I, C.t. II, C.t. III und C.t. IV aufgetrennt werden. Ausgehend von 30.2 mg Fraktion I erhielten wir auf diese Weise in 11 Durchläufen insgesamt die in Tab. 9, S. 90, angegebenen Ausbeuten. Fraktion II wurde in demselben HPLC-System getrennt. Die Ausbeuten sind ebenfalls in Tab. 9 wiedergegeben. Fraktion III konnte mit 45%igem Acetonitril in isokratischer Arbeitsweise in 7 Fraktionen getrennt werden (vgl. Tab.9).

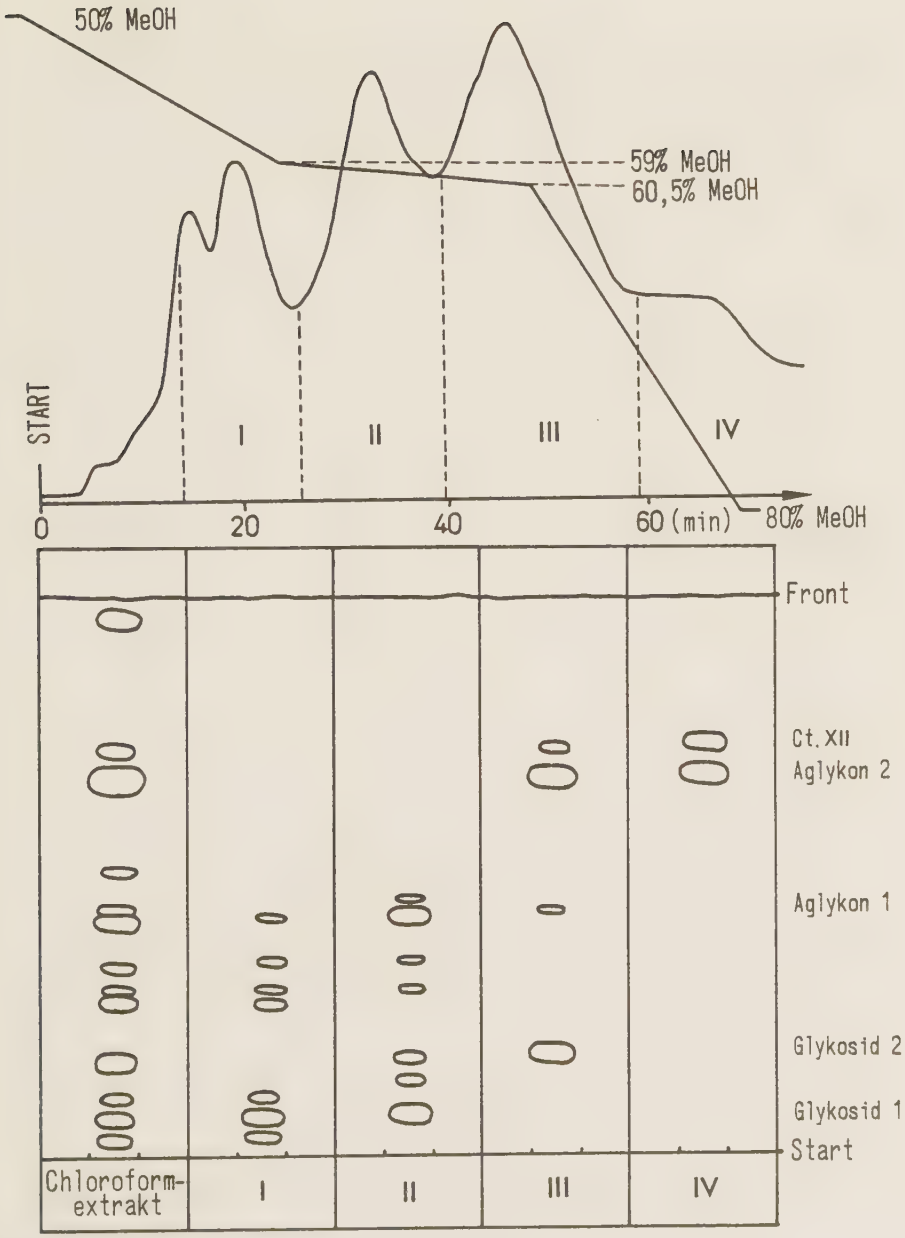


Abb. 41

Präparative HPLC des Chloroformextraktes von Tayuyae radix (PTS 1; vgl.Exp.Teil) und DC der Fraktionen (Chloroform-Methanol 9:1)

Tabelle 9: Ergebnisse der semipräparativen Isolierung

Fraktion	Substanz	Ausbeute (mg)	Reinheit
I (30.2 mg)	C.t. I	3.0	94.0%
	C.t. II	3.6	verunreinigt
	C.t. III	4.6	verunreinigt
	C.t. IV	zu Fraktion II hinzugefügt	
II (129.7 mg)	C.t. IV	45.5	verunreinigt
	C.t. V	92.1	verunreinigt
	C.t. VI	12.1	verunreinigt
III (52.0 mg)	C.t. VII	14.7	verunreinigt
	C.t. VIII	5.4	verunreinigt
	C.t. IXa	0.2	verunreinigt
	C.t. IXb	3.9	verunreinigt
	C.t. X	23.0	96.5%
	C.t. XI	2.2	verunreinigt
	C.t. XII	2.0	95.0%

Fraktion IV wurde nicht näher untersucht, da sie ebenfalls C.t. X und C.t. XII als Hauptkomponenten enthielt.

Bei der analytischen Überprüfung der isolierten Verbindungen stellten wir fest, daß nur C.t. I, C.t. X (= Aglykon 2) und C.t. XII in genügender Reinheit (94.0%, 96.5% bzw. 95.0%) erhalten worden waren. Die anderen Substanzen waren noch mehr oder weniger verunreinigt und mußten einer weiteren semipräparativen Anreicherung unterzogen werden. Hierzu wurden nur die Fraktionen C.t. IV, C.t. V, C.t. VI und C.t. VII herangezogen, die in größerer Menge vorlagen.

Substanz C.t. IV (= Glykosid 1), die u.a. noch mit C.t. V verunreinigt war, konnte durch wiederholte semipräparative HPLC schließlich mit einer Ausbeute von 6.3 mg in 95.3%iger Reinheit erhalten werden. Gleichzeitig fielen 4.8 mg C.t. V

(= Aglykon 1) (98.4% rein) als Nebenprodukt an. Die semipräparative Reinigung der eigentlichen Fraktion von C.t. V erbrachte weitere 17.7 mg von Aglykon 1.

C.t. VI und C.t. VII wurden gemeinsam weiter gereinigt, da sie dieselbe Hauptkomponente (Aglykon 2) enthielten. Mittels semipräparativer HPLC konnten wir Aglykon 2 (C.t. VI) in einer Ausbeute von 10.8 mg (96.0% rein) isolieren.

4. Identifizierung der isolierten Verbindungen

4.1. Substanz C.t. I

Durch chromatographischen Vergleich (DC und HPLC) konnten wir feststellen, daß es sich um das Flavonglykosid Swertisin handelt, das wir auch aus dem Ethanolextrakt von Tayuyae radix isoliert haben (vgl. Abschnitt V., S. 105).

4.2. Identifizierung von C.t. IV (= Glykosid 1) und C.t. V (= Aglykon 1)

Bereits bei den Voruntersuchungen hatte sich gezeigt, daß es sich bei C.t. IV vermutlich um ein Glykosid handelte. Wir unterwarfen C.t. IV daher zunächst einer enzymatischen Hydrolyse im Mikromaßstab. Durch 24stündige Cellulase-Einwirkung und anschließende Ausschüttelung mit Chloroform erhielten wir das Aglykon, das nach DC und HPLC mit C.t. V identisch war (vgl. Abb. 42, S. 92). Nach Hydrolyse von C.t. IV mit Trifluoressigsäure konnte dünnschichtchromatographisch D-Glucose nachgewiesen werden. Dem Retentions- und R_f-Verhalten zufolge sollte es sich bei C.t. IV um ein Monoglucosid handeln.

Eine endgültige Klärung erreichten wir durch Aufnahme des Massenspektrums. Da die übliche EI-MS-Technik erfahrungsgemäß selbst bei Cucurbitacinaglykonen keine oder nur sehr kleine Molekülpeaks liefert (102), kamen als schonende Ionisationsverfahren (103) die Chemische Ionisation (CI),

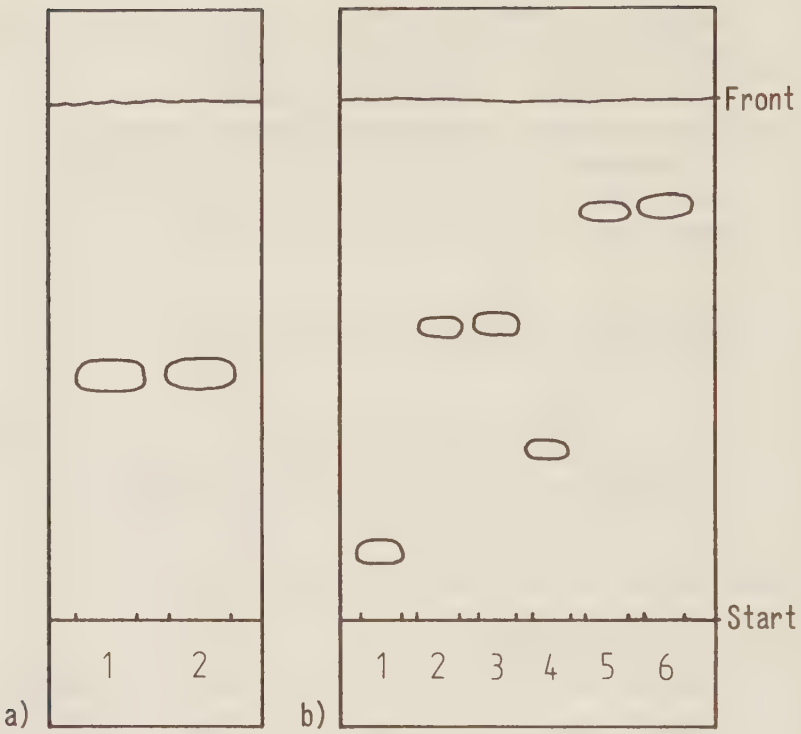


Abb. 42

DC-Nachweis der Glucose und Zuordnung der Aglykone von C.t. IV und C.t. VI

a) LM: Chloroform-Methanol-Wasser 64:50:10
Detektion: Diphenylamin-Reagenz (blaue Zonen im vis)
1 = Trifluoressigsäurehydrolysat von C.t. IV (Glykosid 1)
2 = D-Glucose

b) LM: Chloroform-Methanol 9:1
Detektion: Vanillin/Phosphorsäure (gelbe Zonen im UV 365 nm)

1 = C.t. IV (Glykosid 1)
2 = Aglykon von C.t. IV
3 = C.t. V (Aglykon 1)
4 = C.t. VI (Glykosid 2)
5 = Aglykon von C.t. VI
6 = C.t. X (Aglykon 2)

die Desorptions Chemische Ionisation (DCI), die Feldionisation (FI) bzw. die Felddesorption (FD), die Elektronenanlagerungs-MS (EA-MS) oder neuerdings die Fast Atom Bombardment (FAB)-Methode (104) in Frage.

Obwohl die EA-MS sich als gut geeignet für Cucurbitacinaglykone erwiesen hatte (105), konnten SEIFERT und ELGAMAL (71) damit bei Cucurbitacinglykosiden keine Molekülpeaks erhalten. Die FI-Technik brachte nach MÜLLER (47) für Elaterinid (Cucurbitacin E-glucosid) keine reproduzierbaren Ergebnisse, während mit Hilfe der FD-MS bei Cucurbitacinglykosiden zumindest Clustermolekülionen (z.B.$(M+Na)^+$) erhalten werden (47,56,106,107). KUPCHAN und Mitarb. (86) erhielten durch CI (Methan) zwar für Isocucurbitacin D und 3-Epi-isocucurbitacin D Molekülionen ($(M+H)^+$), aber nicht bei Dihydrocucurbitacin B.

Da die DCI-Methode sich neben der FD-Technik (108) allgemein als sehr gut geeignet für Glykoside erwiesen hatte (103), wählten wir die DCI-MS mit Ammoniak als Reaktantgas. Im Falle von Glykosid 1 konnte ein deutlicher Molekülpeak bei m/z 680 erhalten werden (vgl. Abb. 43, S. 94). Zusätzlich trat ein Ion bei m/z 681 ($(M+H)^+$) auf. Ein weiterer Peak bei m/z 662 war durch Wasserabspaltung entstanden (M-18). Das Aglykon ergab Signale bei m/z 520 und 502. Glucose war über den Peak m/z 180 und dessen Fragmente deutlich nachweisbar. Somit stand fest, daß es sich um ein Cucurbitacinmonoglucosid mit dem Molekulargewicht 680 handelt.

Vom UV-Spektrum wußten wir, daß ein 1,2,23,24-Tetrahydrocucurbitacin vorlag. Da sich nur das Aglykon mit TTC rot anfärbte, mußte der Zucker am C-2 O-glykosidisch gebunden sein.

All diese Daten stimmten mit den Literaturwerten von 1,2,23,24-Tetrahydrocucurbitacin I-glucosid (= Cucurbitacin R-glucosid) überein, das bereits aus Bryonia alba L. (74) und Anagallis arvensis L. (Arvenin IV) (109) isoliert worden war.

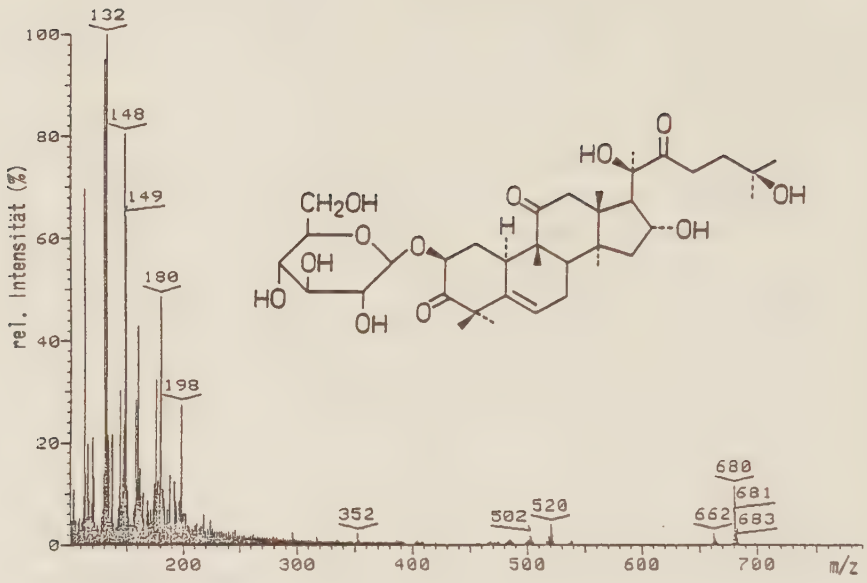


Abb. 43

DCI-Massenspektrum von C.t. IV (Glykosid 1)
(Reaktantgas: Ammoniak)

Bei C.t. V (Aglykon 1) sollte es sich folglich um Cucurbitacin R handeln. UV- und IR-Spektrum glichen dem von Glykosid 1, mit der Ausnahme, daß im IR-Spektrum von Aglykon 1 die OH-Valenzschwingung weniger stark ausgeprägt und der Bereich der C-O-Valenzschwingung besser aufgelöst war. Deutlich sichtbar war eine Bande bei 1125 cm^{-1}, die nach CATTEL (110) für die 3-Keto-2-ol-Cucurbitacine typisch ist. Die für Diosphenole charakteristische Bande bei 1665 cm^{-1} (105) fehlte (vgl. Abb. 44, S. 95).

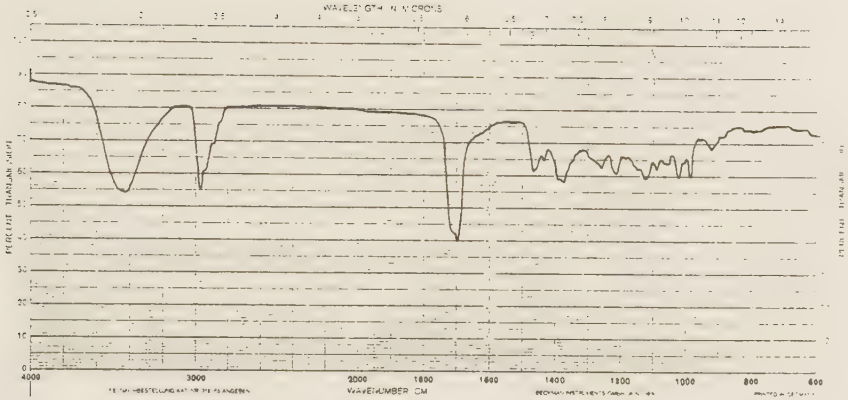


Abb. 44

IR-Spektrum von C.t. V (Aglykon 1)

Die Rotfärbung mit TTC bewies zusätzlich die α-Ketolstruktur, während die Gelbfärbung mit Vanillin/Phosphorsäure für die gesättigte Seitenkette sprach.

Im EI-Massenspektrum konnte nur ein sehr schwacher Molekülpeak bei m/z 518 festgestellt werden. Dafür war das ausgeprägte Fragmentierungsmuster für Cucurbitacine typisch: Die Peaks bei m/z 500 und m/z 482 deuteten auf eine zweifache Wasserabspaltung hin. Ein Peak bei m/z 353 fehlte, was lt. AUDIER (102) ein Indiz für die Abwesenheit einer 1,2-Doppelbindung war. Dafür trat das Fragment m/z 166 auf, das aus einem Retro-Diels-Alder-Bruch im Ring B resultierte und die α-Ketolstruktur im Ring A belegte. Die beiden Fragmente m/z 403 und m/z 385 entstanden durch einen Bindungsbruch zwischen C-20 und C-22 und deuteten ebenfalls auf ein α-Ketolcucurbitacin (53). Da das für eine 23,24-Doppelbindung in der Seitenkette typische Fragment bei m/z 96 fehlte, mußte diese gesättigt vorliegen.

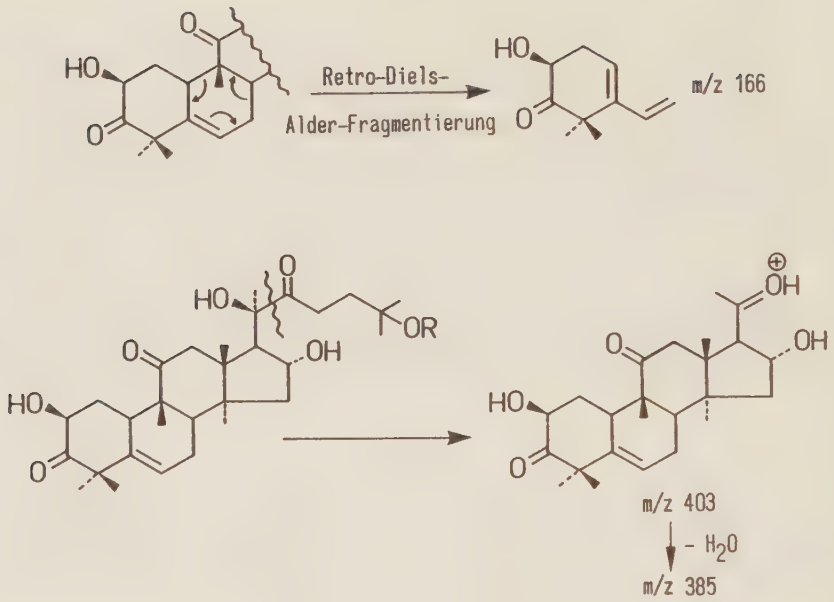


Abb. 45

Typische Fragmentierungen von Cucurbitacinen bei der EI-MS

Zum endgültigen Beweis des Molekulargewichtes wurde ein FAB-Massenspektrum aufgenommen. Bei den negativen Ionen konnte der Basispeak bei m/z 517 erhalten werden, der als $(M-H)^-$ zu interpretieren war (vgl. Abb. 46, S. 97). Damit war das Molekulargewicht von 518 gesichert. Der Peak bei m/z 275 stammte vom Glycerin $((Glyc.)_3-H)^-$, in dem die Probe suspendiert worden war.

Der DC-Vergleich von Aglykon 1 mit dem Reaktionsprodukt der katalytischen Hydrierung von Cucurbitacin I (siehe Kapitel 1) ergab völlige Übereinstimmung mit der α-Ketolzone (Tetrahydrocucurbitacin I).

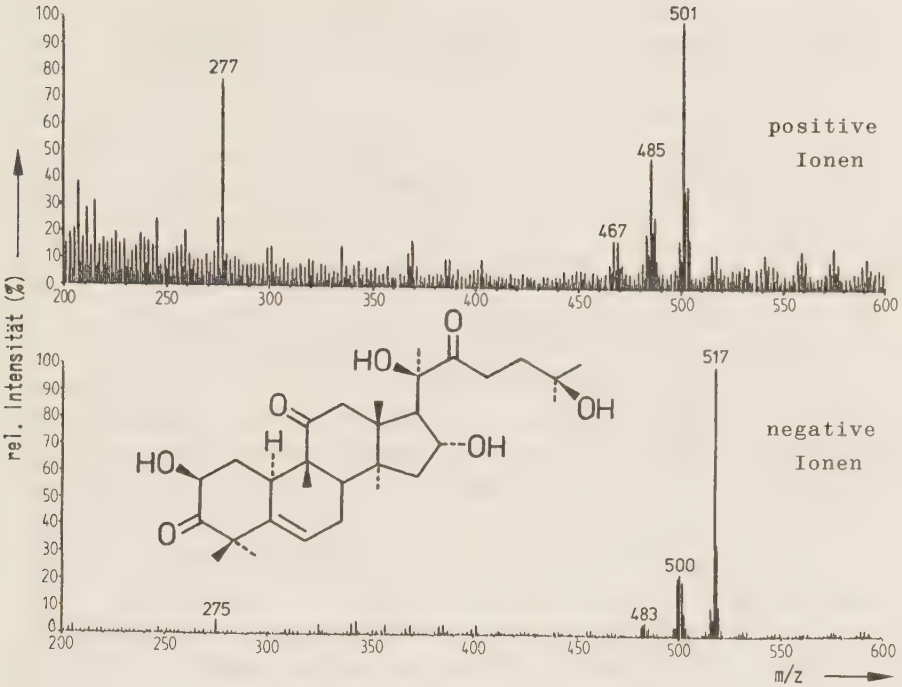


Abb. 46

FAB-Massenspektrum von C.t. V (Aglykon 1)

Aglykon 1 (C.t. V) war damit als Cucurbitacin R (= 1,2,23, 24-Tetrahydrocucurbitacin I) identifiziert.

Cucurbitacin R ist bereits aus Ecballium elaterium L. (70), Bryonia dioica JACQ. (33,81,110), Bryonia alba L. (55,74), Cucurbita lundelliana BAILEY (51) und Anagallis arvensis L. (111) isoliert worden.

4.3. Identifizierung von C.t. VI (Glykosid 2) und C.t. X (Aglykon 2)

Die enzymatische Hydrolyse von Glykosid 2 ergab, daß es sich bei C.t. VI und C.t. X wieder um ein Glykosid/Aglykon-Paar handelte (vgl. Abb. 42, S. 92). Als Zuckerkomponente konnte erneut D-Glucose nachgewiesen werden. Die bei Glykosid 2 fehlende, bei Aglykon 2 aber vorhandene Reaktion mit TTC ließ ein 2-O-Glykosid erwarten. Aufgrund der R_f-Wert- und Retentionszeitverschiebung von Glykosid 2 und Aglykon 2 gegenüber Glykosid 1 und Aglykon 1 mußte es sich hier um lipophilere Cucurbitacine handeln. Die R_f-Verschiebung entsprach den Werten, wie sie z.B. bei den sich nur durch eine Acetylgruppe am C-25-OH unterscheidenden Cucurbitacinen B und D auftreten. Es war daher zu vermuten, daß es sich bei Glykosid 2 und Aglykon 2 um entsprechende Abkömmlinge von Cucurbitacin R-glucosid (Glykosid 1) bzw. Cucurbitacin R (Aglykon 1) handelte.

Die identischen UV-Spektren und die gleiche gelbe Fluoreszenz mit Vanillin/Phosphorsäure sprachen ebenfalls für ein gemeinsames Grundgerüst.

Im DCI-Massenspektrum (Ammoniak) konnte für Glykosid 2 ein Molekülpeak, bei m/z 722 erhalten werden. Die Glucose (m/z 180) war ebenfalls wieder deutlich nachweisbar. Im übrigen war die Fragmentierung ähnlich wie bei Glykosid 1. Lediglich ein Peak bei m/z 212 trat zusätzlich auf.

Das gefundene Molekulargewicht von 722 bestätigte die Identität mit 23,24-Dihydrocucurbitacin B-glucosid, dem 25-O-Acetylderivat von Cucurbitacin R-glucosid (Glykosid 1).

23,24-Dihydrocucurbitacin B-glucosid wurde bisher erst einmal von YAMADA und Mitarb. (109,112) aus Anagallis arvensis L. isoliert und mit "Arvenin II" bezeichnet.

Da C.t. X nach den Hydrolyseversuchen das Aglykon dazu darstellt, sollte es sich dabei um 23,24-Dihydrocucurbitacin B handeln.

Das IR-Spektrum stimmte weitgehend mit dem von Aglykon 1 (Cucurbitacin R) überein. Lediglich eine verstärkte Carbonylbande bei 1710 cm^{-1} deutete auf eine zusätzliche Estergruppe hin.

Die Rotfärbung mit TTC sowie die gelbe Fluoreszenz mit Vanillin/Phosphorsäure bestätigten die α-Ketolstruktur bzw. die gesättigte Seitenkette.

Das DCI-Massenspektrum mit Isobutan als Reaktantgas brachte wider Erwarten keinen Molekülpeak, sondern nur einen Peak mit der größten Masse bei m/z 501, der durch Abspaltung von Essigsäure ($(M-HOAc+H)^+$) entstanden war.

Das EI-Massenspektrum von Aglykon 2 (C.t. X) entsprach dagegen im wesentlichen dem von Aglykon 1 und stimmte mit den Literaturangaben von 23,24-Dihydrocucurbitacin B (51,81) überein.

Ein protonenbreitbandentkoppeltes ^{13}C-NMR-Spektrum von Aglykon 2 (10 mg in C_5D_5N) entsprach ebenfalls in allen Werten einem von YAMADA und Mitarb. (113) publizierten Spektrum von 23,24-Dihydrocucurbitacin B. Eine Zuordnung der Signale war auf Grund der Angaben von YAMADA und Mitarb. (113) und neuerer Ergebnisse von VANDE VELDE und LAVIE (114) sowie BULL und Mitarb. (115) möglich (vgl. Abb. 47, S. 100 und Tab. 10, S. 101). Den beiden letztgenannten Arbeitsgruppen gelang es, auch die Methylgruppen weitgehend zuzuordnen, sowie die von YAMADA und Mitarb. (113) getroffene Zuordnung für C-8 und C-10 zu berichtigen.

Die Verschiebung von ca. 24 ppm für das C-7, die aus einem starken γ-Effekt der C-19-Methylgruppe resultiert, wird als charakteristisches Kennzeichen des Cucurbitangrundgerüstes angesehen. Das Signal bei δ 170.16 ppm ist dem Carboxylkohlenstoff der Acetylgruppe am C-25 zuzuordnen.

Damit steht zweifelsfrei fest, daß es sich bei Aglykon 2 (C.t. X) um 23,24-Dihydrocucurbitacin B handelt.

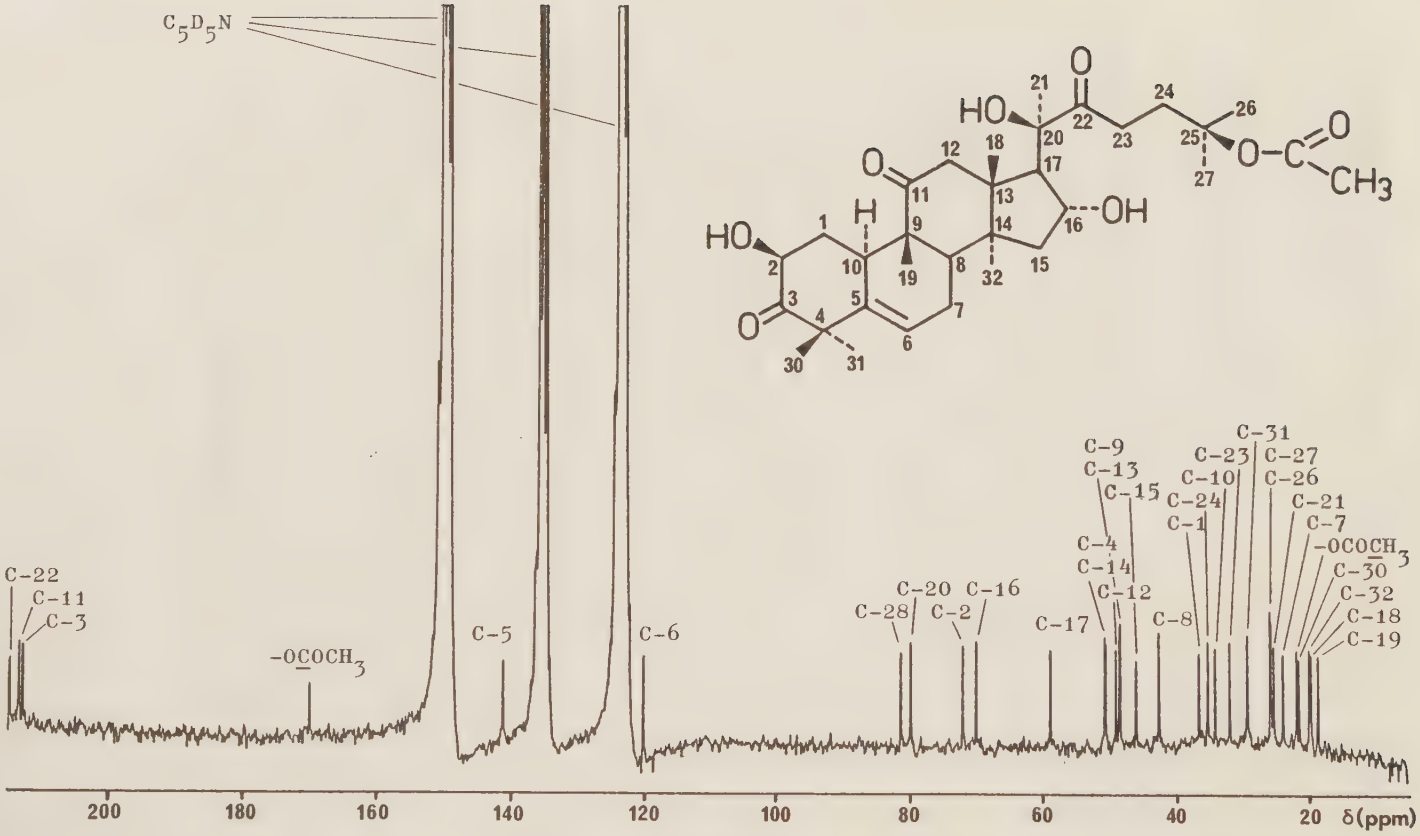


Abb. 47

50.3 MHz-^{13}C-NMR-Spektrum von Aglykon 2 (10 mg in C_5D_5N); protonenbreitbandentkoppelt

Tabelle 10: Vergleich der ^{13}C-NMR-Verschiebungen (ppm) von Aglykon 2 und 23,24-Dihydrocucurbitacin B (113); Zuordnung nach (113), (114) und (115)

Kohlenstoff	Aglykon 2[+)]	23,24-Dihydrocucurbitacin B[++)]
C-1	36.86	36.8
2	72.44	72.2
3	212.82	212.1
4	50.88	50.8
5	141.44	140.9
6	120.30	119.8
7	24.18	24.1
8	42.90	42.7
9	48.75	48.6
10	34.34	34.2
11	213.24	212.5
12	49.37	49.2
13	48.86	48.6
14	51.02	50.8
15	46.36	46.2
16	70.42	70.1
17	59.15	58.9
18	20.01	20.0
19	19.00	19.0
20	80.19	79.9
21	25.53	25.5
22	214.59	214.4
23	32.19	32.2
24	35.45	35.3
25	81.66	81.4
26	26.07 [+++)]	26.0 [+++)]
27	25.97 [+++)]	26.0 [+++)]
30	21.83	21.8
31	29.45	29.4
32	20.31	20.3
$-O\underline{C}OCH_3$	170.16	169.6
$-OCO\underline{C}H_3$	22.16	22.1

+) 10 mg in C_5D_5N; Bruker WP-200 (50.3 MHz)
++) in C_5D_5N/TMS; JEOL FX-60 (15.0 MHz) (113)
+++) Verschiebungen vertikal vertauschbar

Die gleiche Verbindung ist bisher aus Marah oreganus HOWELL (101), Bryonia dioica JACQ. (81), Bryonia alba L. (74), Begonia tuberhybrida VOSS var. alba (200) und Cucurbita lundelliana BAILEY (51) isoliert worden.

4.4. Identifizierung von C.t. XII

C.t. XII, das im LM-System Chloroform-Methanol (9:1) bei der DC nur wenig höher als Aglykon 2 (23,24-Dihydrocucurbitacin B) läuft, ließ sich mit HPLC gut abtrennen (vgl. Abb. 38, S. 83; C.t. X = Peak Nr. 18). Eine bessere DC-Trennung gelang mit reinem Diethylether als Laufmittel (101) (vgl. Abb. 48, S. 103).

Rotfärbung mit TTC und gelbe Fluoreszenz mit Vanillin/Phosphorsäure deuteten wieder auf ein α-Ketolcucurbitacin mit gesättigter Seitenkette hin; ebenso das UV-Spektrum.

Im FAB-MS konnten wir ein Molekülion bei m/z 559 ($(M-H)^-$) erhalten. Das Molekulargewicht von 560 entsprach dem von 23,24-Dihydrocucurbitacin B (Aglykon 2). Es mußte sich deshalb um eine dazu isomere Verbindung handeln.

Da nach CATTEL und Mitarb. (110) bei der katalytischen Hydrierung eine Isomerisierung am C-2 und C-3 eintreten kann, wurde C.t. XII mit dem Hydrierungsprodukt von Cucurbitacin B verglichen (Abb. 48, S. 103).

C.t. XII erwies sich als identisch mit der obersten Zone, die noch über der von CATTEL (110) beschriebenen Zone von Isocucurbitacin B lag. Da nach KUPCHAN und Mitarb. (101) 3-Hydroxy-2-oxo-cucurbitacine höhere R_f-Werte als die entsprechenden 2-Hydroxy-3-oxo-Verbindungen haben, und 23,24-Dihydrocucurbitacine immer über den entsprechenden ungesättigten Komponenten liegen, könnte es sich bei C.t. XII um 23,24-Dihydroisocucurbitacin B handeln.

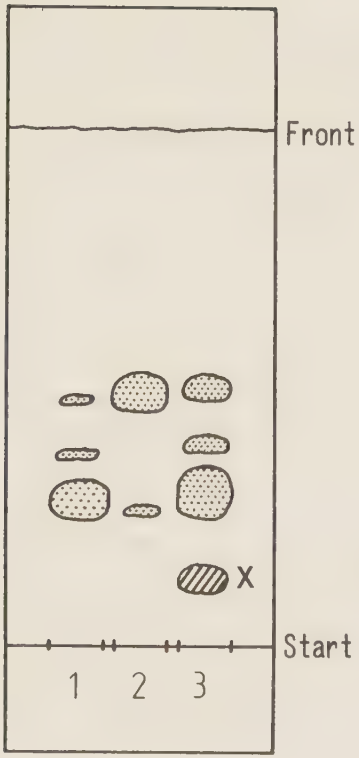


Abb. 48

DC-Vergleich von C.t. X, C.t. XII und dem Hydrierungsprodukt von Cucurbitacin B

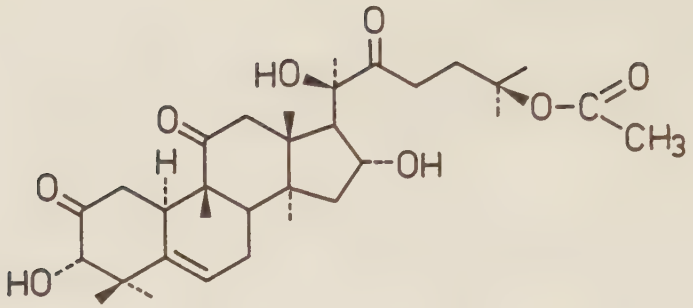
LM: Diethylether
Detektion: Vanillin/Phosphorsäure

= gelb im UV 365 nm

= rot im UV 365 nm

1 = C.t. X (23,24-Dihydrocucurbitacin B)
2 = C.t. XII
3 = Hydrierungsprodukt von Cucurbitacin B
X = Cucurbitacin B

Dieses Cucurbitacin ist bereits einmal aus Marah oreganus HOWELL isoliert worden (86). KUPCHAN schloß damals nicht aus, daß es sich um ein Artefakt handeln könnte, da er gefunden hatte, daß 2β-Hydroxy-3-oxo-Cucurbitacine unter Säure- bzw. Baseneinfluß leicht isomerisieren. In unserem Fall mußte es sich jedoch um eine genuin vorkommende Verbindung handeln, da C.t. XII im Chloroformextrakt nachweisbar ist und die Isolierung unter Ausschluß von Säuren und Basen erfolgte.



23,24-Dihydroisocucurbitacin B

5. Identifizierung von Cucurbitacin B und Cucurbitacin B-glucosid

Aufgrund der UV-Spektren, die jeweils ein Maximum bei 230 nm aufweisen, und der Retentionszeiten (Vergleich mit Referenzsubstanzen) handelt es sich bei Peak 10 und Peak 15 (vgl. Abb. 38, S. 83) um Cucurbitacin B-2-O-glucosid und Cucurbitacin B.

V. Isolierung und Identifizierung der Flavonoide aus der Wurzel von Cayaponia tayuya (VELL.)COGN.

Die Zahl der bisher in der Cucurbitaceenfamilie rein isolierten und chemisch eindeutig charakterisierten Flavonoide ist gering (98,116,117). Anfänglich wurden fast ausschließlich O-Glykoside (vor allem Kämpferolderivate) gefunden (Lit. siehe (98)), später vermehrt auch C-Glykoside (hauptsächlich Apigeninabkömmlinge; Lit. bei (116,117)).

1. Extraktion und Analytik der Flavonoide

Der Ethanol- bzw. Methanolextrakt der mit Petrolether und Chloroform vorbehandelten Wurzel von Cayaponia tayuya enthielt neben Spuren von Cucurbitacinen (vgl. Abb. 7, S. 20) vor allem Flavonoide.

Mit dem Laufmittelsystem Ethylacetat-Ameisensäure-Eisessig-Wasser (100:11:11:27) konnten wir dünnschichtchromatographisch nach Detektion mit Naturstoff/PEG-Reagenz zehn entsprechende Zonen nachweisen (vgl. Abb. 49, S. 106).

Die Flavonoide ließen sich von den Cucurbitacinen dadurch unterscheiden, daß sie nach Detektion mit Vanillin/Phosphorsäure im UV-365 nicht gelb bzw. rot, sondern meist blau fluoreszierten. Mit Naturstoff/PEG entstehen gelbgrüne bzw. rötliche Fluoreszenzen, während Cucurbitacine nicht reagieren. Färbungen und Laufverhalten der Flavonoide ließen auf Apigenin- bzw. Kämpferol- oder Isorhamnetinglykoside schließen (118).

Da nach salzsaurer Hydrolyse keine Aglykone zu beobachten waren, sollte es sich um C-Glykoside handeln (119).

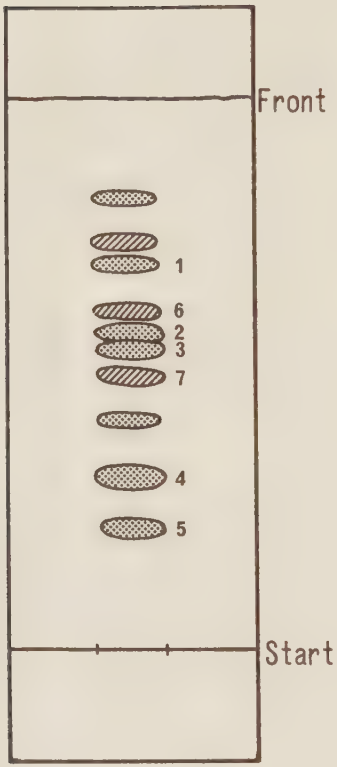


Abb. 49

DC-Trennung des Methanolextraktes von Tayuyae radix

LM: Ethylacetat-Ameisensäure-Eisessig-Wasser (100:11:11:27)

Detektion: Naturstoff/PEG

= gelbgrün im UV 365 nm

= rötlich im UV 365 nm

1 = Vitexin
2 = Isovitexin
3 = Swertisin
4 = Spinosin
5 = Vicenin 2
6 = Orientin
7 = Isoorientin

Durch HPLC des Methanolextraktes ließen sich die Flavonoide im Cucurbitacin-Trennsystem innerhalb der ersten 12 min eluieren. Nach den von den Peaks aufgenommenen UV-Spektren mußte es sich um Flavone handeln (siehe Abb. 38, S. 83).

Eine optimierte Trennung wurde im Flavonoid-Trennsystem von TITTEL und WAGNER (120) erzielt (vgl. Abb. 50).

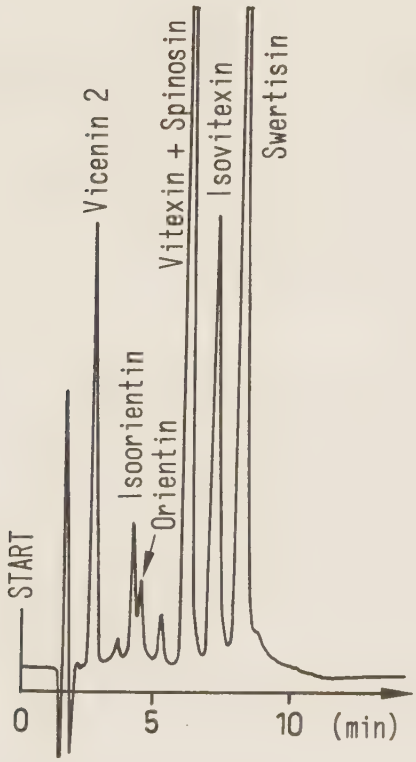


Abb. 50

HPLC-Trennung des Methanolextraktes von Tayuyae radix im System TS 10 (siehe Exp.Teil)

2. Isolierung und Identifizierung der Flavonoide

Nach Vorextraktion der Droge mit Petrolether und Chloroform wurde erschöpfend mit Ethanol ausgezogen. Beim Einengen der Lösung fiel ein Niederschlag an, der nach dem Dünnschichtchromatogramm aus den zwei Hauptkomponenten des Extraktes bestand. Diese ließen sich durch fraktionierte Kristallisation trennen: Aus 50%igem Methanol fiel zunächst die weniger polare Komponente 3 aus, dann nach längerem Stehen die polarere Verbindung 4.

Die UV-Spektren mit Maxima bei 272 und 334 nm, und die bathochrome Verschiebung der Bande I mit $AlCl_3$ sprachen in beiden Fällen für Flavone mit freier 5-Hydroxygruppe (121).

Das Massenspektrum (EI; 70eV) der permethylierten Verbindung 3 ergab einen Molekülpeak bei m/z 530. Das Auftreten eines intensiven Peaks bei m/z 499 (M^+-31) deutete auf ein Flavon-6-C-glykosid, m/z 355 (M^+-175) speziell auf ein 6-C-Hexosid (122), wobei es sich auf alle Fälle um ein Monoglykosid handeln mußte.

Das Protonen-NMR-Spektrum von 3 in DMSO-d_6 zeigte ein Drei-Protonen-Singulett bei δ 3.91 ppm (MeO), ein Singulett von zwei Protonen bei δ6.86 ppm (H-3 und H-8), zwei Paare von orthogekoppelten Dubletts mit je zwei Protonen bei δ6.98 ppm (J=9Hz; H-3' und H-5') und δ8.03 ppm (J=9Hz; H-2' und H-6'), ein Dublett von einem Proton bei δ4.69 ppm (J=10Hz; H-1"), sowie zwei Signale bei δ10.47 ppm (4'-OH) und 13.62 ppm (5-OH). Die Integration der im Bereich von 3.0 - 3.8 ppm erscheinenden Zuckerprotonen bestätigt mit 9 Protonen eine Hexose. Die hohe Kopplungskonstante zwischen dem H-1" und dem H-2" (J=10Hz) des Zuckers spricht für eine β-Konfiguration (116).

3 stimmte damit in allen Daten mit Swertisin (= 7-O-Methylvitexin) überein. Ein chromatographischer Vergleich (DC und HPLC) bestätigte zusätzlich die Identität.

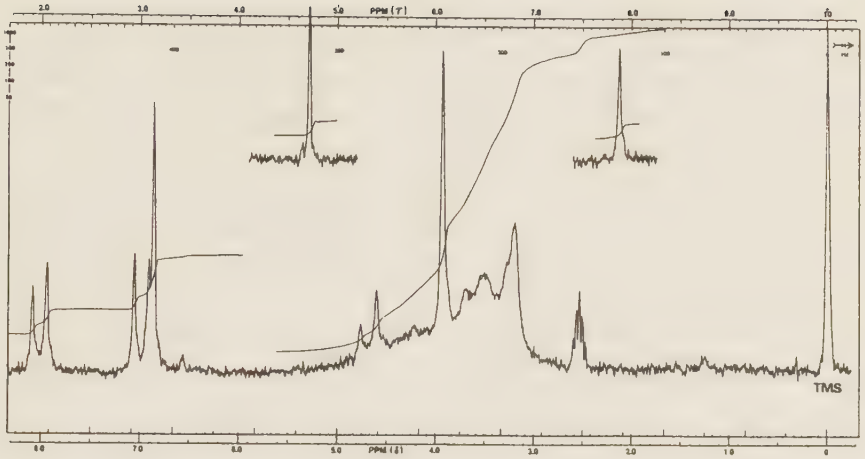


Abb. 51

60 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von Swertisin in DMSO-d_6

Das Massenspektrum (EI; 70eV) der permethylierten Verbindung 4 ergab einen Molekülpeak bei m/z 734. Die Fragmentierung ließ zwei Zuckerreste vermuten. Das Spektrum erwies sich als identisch mit dem von Spinosin (= Swertisin-2"-O-glucosid), das kürzlich erstmals von WOO und Mitarb. (123) aus den Samen von Zizyphus vulgaris var. spinosus (Rhamnaceae) isoliert worden ist. Eine ähnliche Verbindung, Melosid A (= Isovitexin-2"-O-glucosid), wurde von MONTIES und Mitarb. (124) auch schon aus einer Cucurbitaceae (Cucumis melo L. var. "Cantaloup Doublon Risser") erhalten.

Aus dem Filtrat des Ethanolextraktes und dem Extrakt der Droge mit 70%igem Methanol konnten durch säulenchromatographische Auftrennung an Polyamid und anschließende Kristallisation Flavonoid 3, 4 und 5 chromatographisch rein erhalten werden.

Flavonoid 5 wies das gleiche UV-Spektrum auf, wie Swertisin und Spinosin. Zusätzlich zur Verschiebung der Absorptionsmaxima mit $AlCl_3$ trat hier aber ein bathochromer Shift der Bande II mit NaOAc, sowie eine zusätzliche Bande bei 334 nm mit NaOMe auf, was beides für eine zusätzliche freie Hydroxylgruppe am C-7 spricht (121).

Im Massenspektrum (EI; 70eV) erhielten wir von der permethylierten Verbindung 5 einen Molekülpeak bei m/z 748. Die Abspaltung von 31 Masseneinheiten deutete auf ein 6-C-Glykosid, wobei das hohe Molekulargewicht und speziell die Tatsache, daß das Ion M^+-31 den Basispeak darstellte, für ein 6,8-Di-C-glucosid sprach (122). Das Fragment m/z 573 (M^+-175) war typisch für 6-C-Hexoside. Das Molekulargewicht und die Fragmentierung erwiesen sich als identisch mit den Werten von Vicenin 2 (= Apigenin-6,8-C-diglucosid). Die Identität konnte auch chromatographisch mit DC und HPLC bestätigt werden.

Zwei weitere Komponenten des Ethanolextraktes konnten spektroskopisch und chromatographisch als Vitexin 1 und Isovitexin 2 identifiziert werden.
Dabei fanden wir, daß Vitexin und Spinosin zwar mit DC trennbar sind, daß sie aber in den verwendeten HPLC-Systemen zusammenfallen.

Vitexin (= Apigenin-8-C-glucosid) und Isovitexin (= Apigenin-6-C-glucosid) sind ebenso wie Swertisin und Vicenin 2 bereits aus zahlreichen Pflanzen isoliert worden (116,117). Für die Cucurbitaceenfamilie ist dies der erste Bericht über ihr Vorkommen.

3. Chromatographische Identifizierung weiterer Flavonoide

Neben den mit Naturstoff/PEG gelbgrün fluoreszierenden Apigeninderivaten waren dünnschichtchromatographisch in geringer Konzentration noch mehrere rötlich/orange fluoreszierende Zonen zu erkennen (vgl. Abb. 49, S. 106). Nach ihren Fluoreszenzeigenschaften mußte es sich dabei um Luteolinabkömmlinge handeln (118).

Durch chromatographischen Vergleich (DC und HPLC) konnten wir zwei dieser Zonen als Orientin 6 und Isoorientin 7 identifizieren. Nur Orientin wurde bisher aus einer Cucurbitaceae isoliert und zwar aus den Blättern von Cucurbita maxima DUCHESNE (125).

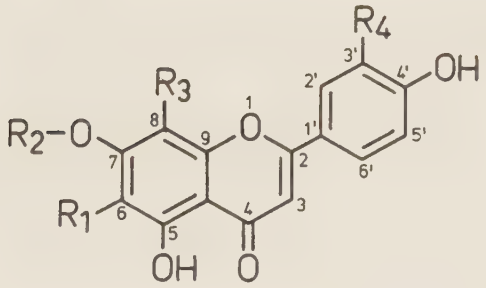


Abb. 52

Formeln der in Tayuyae radix nachgewiesenen Flavonoide

	R_1	R_2	R_3	R_4
1 Vitexin	H	H	glc	H
2 Isovitexin	glc	H	H	H
3 Swertisin	glc	CH_3	H	H
4 Spinosin	glc-glc	CH_3	H	H
5 Vicenin 2	glc	H	glc	H
6 Orientin	H	H	glc	OH
7 Isoorientin	glc	H	H	OH

VI. Pharmakologische Untersuchungen

Der Ethanolextrakt von Tayuyae radix wurde am National Cancer Institut (NCI), Bethesda, Maryland, USA, auf Zytotoxizität getestet. Er erwies sich im KB-System (Zellkulturen von menschlichem Nasopharynx-Epidermis Karzinom) als wirksam (NSC B 83 87 98). Im in vivo-Versuch an weiblichen Mäusen mit P 388-Lymphozytenleukämie zeigte er keine Aktivität.

Der Chloroformextrakt hatte in beiden Testen keine signifikante Wirksamkeit (NSC B 83 87 99).

In ersten Versuchen zur Beeinflussung der Phagozytoseleistung von Granulozyten in einem modifizierten Test nach BRANDT (126) bewirkte Cucurbitacin E in der Verdünnung 10^{-6}% eine 25%ige Phagozytosesteigerung, während es sich in hoher Konzentration als zytotoxisch erwies (127).

VII. Diskussion der in Kapitel 2 erhaltenen Ergebnisse

Die Identifizierung von Cucurbitacin R, 23,24-Dihydrocucurbitacin B, Cucurbitacin B und deren Glukosiden, sowie von 23,24-Dihydroisocucurbitacin B aus den Wurzeln von Cayaponia tayuya (VELL.)COGN. stellt den ersten Bericht über Cucurbitacine in der Gattung Cayaponia dar. Damit bestätigt sich erneut der Zusammenhang zwischen bitterem Geschmack und Cucurbitacinvorkommen. Entsprechend sind auch noch in einigen anderen Cayaponiaarten Cucurbitacine als Inhaltsstoffe zu vermuten. Ein relativ schnelles Screening ist mit der beschriebenen HPLC-Methode möglich.

Das Inhaltsstoffmuster von Cayaponia tayuya ist bisher noch in keiner anderen Cucurbitaceenart nachgewiesen worden. Bezüglich der Cucurbitacine fällt auf, daß aus Anagallis arvensis L. kürzlich die gleichen Verbindungen isoliert wurden, obwohl diese Pflanze zur Familie der Primulaceen zählt. Die chemotaxonomische Bewertung dieses Befundes spricht unserer Meinung nach eher für ein ubiquitäres Vorkommen der Cucurbitacine, als für eine Verwandtschaft der beiden Arten.

Da von WHITEHOUSE und DOSKOTCH (18) bereits eine Wirkung der Cucurbitacine auf Lymphozyten berichtet worden war und von uns eine Phagozytosesteigerung der Granulozyten festgestellt werden konnte, ist zu vermuten, daß Cucurbitacine in unspezifischer Weise das Immunsystem beeinflussen. Dies würde auch die häufige Verwendung cucurbitacinhaltiger Drogen in der Volksmedizin gegen Rheuma und Arthritis erklären. Zum endgültigen Beweis dieser Theorie sind allerdings noch weitere pharmakologische Prüfungen nötig.

Bei den zusätzlich identifizierten Flavonoiden Vitexin, Isovitexin, Swertisin, Spinosin, Vicenin 2, Orientin und Isoorientin handelt es sich um Flavon-C-glykoside vom Apigenin- bzw. Luteolintyp. Bisher lagen keine Hinweise über

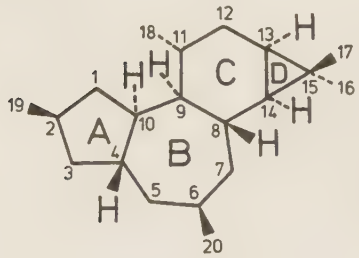
ein ähnlich konzentriertes Auftreten in einer anderen Cucurbitaceenwurzel vor. Von den o.a. Flavonglykosiden wurde bisher lediglich Orientin in einer Cucurbitaceae nachgewiesen. Spinosin ist im Pflanzenreich zum zweitenmal isoliert worden. Der geringe Kenntnisstand über die Inhaltsstoffe dieser Pflanzenfamilie erlaubt noch keine chemotaxonomische Bewertung dieser Befunde.

Kapitel 3:

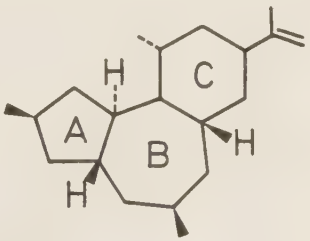
Die HPLC von Diterpenestern aus Euphorbiaceen

I. Chemie der Phorbolester

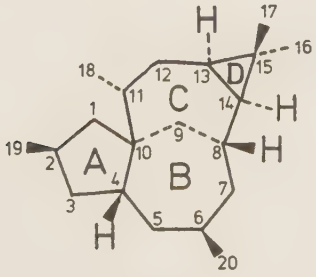
Die Phorbolester, oder allgemeiner, nach einem Vorschlag von ADOLF und HECKER (128), "Tiglianester", stellen tetrazyklische Diterpenester dar. Sie besitzen ein Tigliangrundgerüst und unterscheiden sich dadurch von den ebenfalls in Euphorbiaceen vorkommenden Diterpenestern mit Daphnan- oder Ingenangrundkörper (vgl. Abb. 53).



Tiglian



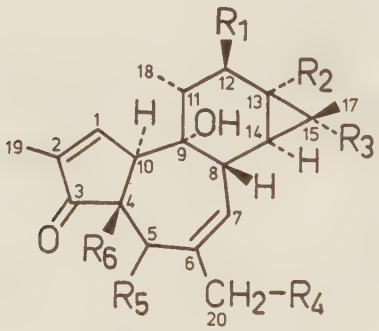
Daphnan



Ingenan

Abb. 53

Phorbol selbst ist ein polyfunktioneller Alkohol mit einer α,β-ungesättigten Ketogruppe im A-Ring, einer isolierten Doppelbindung im B-Ring, einer Glykolgruppierung am C-12 und C-13, einer primären Hydroxylgruppe am C-20 und tertiären Hydroxylgruppen an C-4 und C-9. Die erstgenannten drei alkoholischen Gruppen können mit kurz- oder langkettigen Fettsäuren verestert sein. Die Ringe A und B sind im natürlich vorkommenden Phorbol trans-verknüpft (4β,10α), während sie im 4α-Phorbol, das vermutlich ein Artefakt darstellt (129), cis-verknüpft (4α,10β) sind. Daneben kommen auch Ester der in Abb. 54 wiedergegebenen Phorbolabkömmlinge vor. Eine Zusammenfassung der Chemie der Phorbolester sowie verwandter Diterpenester findet man in Übersichtsartikeln (130,131,132).



R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	
OH	OH	CH_3	OH	H	OH	Phorbol
OH	OH	CH_3	OH	H	H	4-Desoxy-phorbol
OH	OH	CH_2OH	OH	H	H	4-Desoxy-16-hydroxy-phorbol
OH	OH	CH_3	OH	OH	H	4-Desoxy-5-hydroxy-phorbol
OH	OH	CH_3	H	OH	H	4,20-Didesoxy-5-hydroxy-phorbol
H	OH	CH_3	OH	H	OH	12-Desoxy-phorbol
H	OH	CH_2OH	OH	H	OH	12-Desoxy-16-hydroxy-phorbol
H	OH	CH_3	OH	OH	OH	12-Desoxy-5-hydroxy-phorbol
H	OH	CH_3	H	H	OH	12,20-Didesoxy-phorbol
OH	OH	CH_2OH	OH	H	OH	16-Hydroxy-phorbol

Abb. 54

Strukturformeln von Phorbol und seinen natürlich vorkommenden Derivaten

II. Verbreitung der Phorbolester

Phorbolester wurden erstmals von den Arbeitsgruppen HECKER (133) und VAN DUUREN (134) aus dem Samenöl der tropischen Euphorbiacee Croton tiglium L. isoliert. Im Anschluß daran fand man Vertreter dieses Strukturtyps auch in verschiedenen anderen Wolfsmilchgewächsen (vgl. Tab. 11).

Tabelle 11: Phorbolesterhaltige Pflanzen
(Phorbolesterderivate unberücksichtigt)

Pflanze	Familie	Literatur
Croton tiglium L.	Euphorbiaceae	130,133,134
Croton sparciflorus MORONG.	Euphorbiaceae	135
Croton rhamnifolius H.B.K.	Euphorbiaceae	136
Sapium japonicum PAX et HOFFM.	Euphorbiaceae	137
Sapium indicum WILLD.	Euphorbiaceae	138
Euphorbia frankiana BERGER	Euphorbiaceae	139
Euphorbia coerulescens HAW.	Euphorbiaceae	139,140
Euphorbia tirucalli L.	Euphorbiaceae	141
Ostodes paniculata BLUME	Euphorbiaceae	142
Aquilaria malaccensis LAMK.	Thymelaeaceae	143

Eine Zusammenfassung über das Vorkommen der Tiglianester und verwandter Diterpenester wurde kürzlich von EVANS und TAYLOR (132) publiziert. Danach stellen die pharmakologisch aktiven Diterpenester bei den Euphorbiaceen ein Charakteristikum der Unterfamilie Crotonoideae dar.

Diterpenester vom Tiglian- und Daphnantyp wurden außer in Euphorbiaceen auch in Thymelaeaceen gefunden (132,143,144), was als Beweis für die phylogenetische Verwandtschaft der beiden Arten gewertet wird (145).

III. Pharmakologische Bedeutung der Phorbolester und verwandter Diterpenester

Die hautirritierende und laxierende Wirkung der Samenöle und Milchsäfte zahlreicher Euphorbiaarten ist seit langem bekannt. Sie fand in der Therapie häufig Anwendung bei der Behandlung von Geschwüren, Warzen und Wassersucht (4). Wegen der toxischen Wirkungen werden sie heute aber außerhalb der Homöopathie und Ethnomedizin nur noch wenig verwendet (9). Crotonöl wurde in Deutschland der Verschreibungspflicht unterstellt.

Die Inhaltsstoffe fanden seit der Entdeckung der cocarcinogenen Wirkung von Crotonöl durch BERENBLUM (146) im Jahre 1941 verstärktes Interesse in der experimentellen Krebsforschung. Den Arbeitsgruppen HECKER (133) und VAN DUUREN (134) gelang schließlich der Beweis, daß die Phorbolester für diese Wirkung verantwortlich sind.

Unter der im "Berenblumexperiment" nachgewiesenen cocarcinogenen Wirkung versteht man einen Zwei-Schritt-Mechanismus, bei dem erst durch eine unterschwellige Dosis eines Carcinogens "schlafende" Tumorzellen initiiert werden, und dann durch die Gabe eines alleine unwirksamen Cocarcinogens das Tumorwachstum angeregt wird.

Alle von HECKER (133) aus Crotonöl isolierten Phorbol-12,13-diester besitzen sowohl entzündliche als auch cocarcinogene Eigenschaften, wobei 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) am stärksten wirksam ist (147). Auf der Haut rufen Phorbolester verstärkte Zellteilung und Hyperplasie hervor (148). Theorien über die Struktur-Wirkungsbeziehungen der Phorbolester enthält Literatur (149).

Bezüglich der molekularen Wirkungsweise der Diterpenester wurden zahlreiche Versuche angestellt. Man fand eine Stimulierung der RNA-, DNA- und Proteinsynthese. In der letzten Zeit mehrten sich die Beweise, daß die Wirkung über Rezeptoren in der Plasmamembran eintritt. Eine ausführliche Zusammenstellung und Bewertung dieser Ergebnisse findet sich in Literatur (131, 132 und 201).

Neben der Cocarcinogenität konnten SOPER und EVANS (150) an auxotrophen Bakterien zwar keine mutagene, aber eine comutagene Wirkung von TPA nachweisen, die nicht über eine Hemmung der DNA-Repair-Mechanismen ablaufen soll.

Es wurden auch zahlreiche Diterpenester mit tumorhemmenden Eigenschaften isoliert, was der überlieferten Wirkung der Euphorbiaceen bei Krebs und Warzen (151) entspricht. KUPCHAN und Mitarb. (152) wiesen für 13-O-Decanoyl-phorbol-12-tiglinat aus Crotonöl und für Ingenol-3,20-dibenzoat aus Euphorbia esula L. erstmals eine in-vivo-Aktivität gegen P388-Lymphozytenleukämie an Mäusen nach. Sie fanden auch für mehrere Daphnanester eine antileukämische Wirkung (153-156). Ebenso konnte die Arbeitsgruppe CORDELL und FARNSWORTH (142,143,157,158) aus verschiedenen Euphorbiaceen Tiglian- und Daphnanester mit Antitumorwirkung isolieren. Auch für TPA und für Crotonöl wurde kürzlich von einer lokalen Tumorregression nach intratumoraler Injektion berichtet (159).

Arbeiten von ABB und Mitarb. (160) und GOLDFARB und Mitarb. (161) über Lymphozytenstimulierung und die Hemmung der Aktivität der Natural Killer Cells durch TPA lassen auch einen Einfluß der Phorbolester auf das Immunsystem vermuten.

IV. Bisherige Analysen- und Isolierungsverfahren für Phorbolester und andere Diterpenester

Zur Analyse der Phorbolester wurden bisher, neben biologischen Testen (147,162), hauptsächlich DC-Verfahren (133,163, 166) verwendet. Letztere sind aber in der Trennleistung oft nicht ausreichend, um sichere Zuordnungen treffen zu können (133,167). Zur Trennung acetylierter Diterpenalkohole wurden die Dünnschichtchromatographie (168) und die Gaschromatographie (169) eigesetzt.

RAO und Mitarb. (170) beschrieben erstmals eine HPLC-Trennung von Phorbol und Phorbolmyristatacetat (=TPA) auf einer Kieselgelsäule mit Isopropanol-Methanol (9:1) bzw. Diethylether-Methanol (9:1) als mobiler Phase. Eine Trennung von TPA von seinen Zersetzungsprodukten ist mit diesem System nach SCHMIDT und HECKER (164) nicht möglich. BERRY und Mitarb. (171) publizierten 1977 ein Kieselgel-HPLC-System (Gradientenelution mit 2,2,4-Trimethylpentan und Isopropanol als Fließmittel) zur Trennung von Phorbol und verschiedenen partialsynthetischen Phorbolestern.

Die Isolierung der Phorbolester erfolgte bisher mit sehr aufwendigen Methoden: Neben Ausschüttelungsverfahren, die der Anreicherung dienten, wurde vor allem die Offene-Säulenchromatographie mit Kieselgel bzw. Florisil^{R} verwendet (130,142, 143,147,172). OCKEN (173) beschrieb eine Isolierung mit Hilfe der Trockensäulentechnik. Die Arbeitsgruppe HECKER (130) verwendet die Flüssig-Flüssig-Verteilungschromatographie vom O'Keefe- und Craig-Typ, während EVANS (163) die Präparative Schichtchromatographie bevorzugt. Kürzlich wurde auch über die Fraktionierung mit der Centrifugal-Liquid-Chromatographie (CLC) berichtet (138). Die DCCC (Droplet-Counter-Current-Chromatographie) wurde erstmals bei der Isolierung der unveresterten Diterpenalkohole Phorbol und 4α-Phorbol verwendet (174). Kürzlich wurde ein DCCC-Verfahren zur Isolierung von Ingenanestern beschrieben (175).

Die Arbeitsgruppen von HIRATA (176,177) und KUPCHAN (152) benutzten erstmals die HPLC zur Reinigung ihrer Verbindungen in Kieselgel-Trennsystemen. ADOLF und HECKER (178) setzten, allerdings mit wenig Erfolg, die reversed-phase HPLC ein. DRIEDGER und Mitarb. (179) trennten drei Desoxyphorbolester mit HPLC.

Nach Beendigung unserer experimentellen Arbeiten erschienen weitere Publikationen, in denen vom Einsatz der HPLC bei der Isolierung von Diterpenestern berichtet wird (180,181,182). Eine chinesische Arbeitsgruppe (183) verwendete die HPLC u.a. zur Isolierung eines Daphnanesters aus Daphne genkwa SIEB. et ZUCC..

Wegen der Empfindlichkeit der Diterpenester gegenüber Hitze, Licht, Sauerstoff, Säuren und Alkalien (132) wurden bei den bisher angewendeten Isolierungsverfahren und bei der Chromatographie mit Kieselgel häufig Hydrolysen, Umesterungen und Autoxidationen beobachtet (130,142,147).

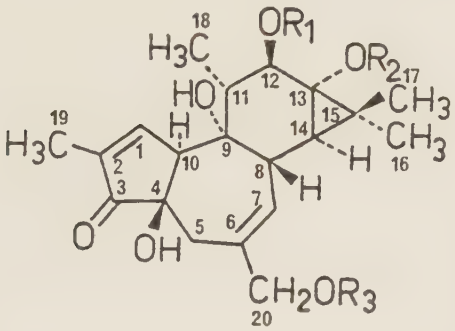
V. Die HPLC-Methode

1. Analyse der Phorbolester im Crotonöl

Da für die Entwicklung einer HPLC-Methode nicht genügend Referenzsubstanzen zur Verfügung standen, verwendeten wir Crotonöl, das Samenöl von Croton tiglium L. (Euphorbiaceae) als Modell für die Trennung der Phorbolester. Die methanollösliche Fraktion von Crotonöl (="Crotonharz") enthält das gesamte toxische Wirkprinzip (vgl. 184). Aus ihm sind bereits zahlreiche Diterpenester isoliert und aufgeklärt worden (130,134). Tabelle 12, S. 123, enthält eine Zusammenstellung der bisher bekanntgewordenen Phorbolester in Crotonöl.

Da sich zeigte, daß Crotonöl wegen des hohen Lipidgehaltes ohne Vorreinigung für die DC und HPLC nicht geeignet ist, wurden verschiedene Anreicherungsversuche unternommen. Beim Vergleich der Resultate nach Ausschütteln von Crotonöl mit unterschiedlichen Methanol/Wasser-Mischungen stellte sich heraus, daß die Phorboldiester am besten mit 90%igem Methanol extrahiert werden. Außerdem wird dabei der Lipidanteil so gering gehalten, daß keine Störungen bei der Chromatographie auftreten. Mit dieser Fraktion, die ca. 7% des eingesetzten Crotonöles ausmacht und im Folgenden mit "Crotonharz" bezeichnet wird, wurden die weiteren Versuche durchgeführt.

Tabelle 12: Phorbolester aus Crotonöl (130)



Crotonöl-faktor	R_f +)	Summenformel	Säurereste R_1	R_2	R_3
A1	0.3	$C_{36}H_{56}O_8$	Tetradecanoyl-	Acetyl-	H-
A2	0.3	$C_{32}H_{48}O_8$	Decanoyl-	Acetyl-	H-
A3	0.3	$C_{34}H_{52}O_8$	Dodecanoyl-	Acetyl-	H-
A4	0.3	$C_{38}H_{60}O_8$	Hexadecanoyl-	Acetyl-	H-
A'5++)	0.3	$C_{29}H_{40}O_8$	Tiglyl-	Butyryl-	H-
B1	0.4	$C_{37}H_{58}O_8$	Methylbutyryl-	Dodecanoyl-	H-
B2	0.4	$C_{35}H_{54}O_8$	Methylbutyryl-	Decanoyl-	H-
B3	0.4	$C_{35}H_{52}O_8$	Tiglyl-	Decanoyl-	H-
B4	0.4	$C_{34}H_{52}O_8$	Acetyl-	Dodecanoyl-	H-
B5	0.4	$C_{33}H_{50}O_8$	Octanoyl-	Methylbutyryl-	H-
B6	0.4	$C_{33}H_{48}O_8$	Tiglyl-	Octanoyl-	H-
B7	0.4	$C_{32}H_{48}O_8$	Acetyl-	Decanoyl-	H-
B'8++)	0.4	$C_{37}H_{56}O_8$	Tiglyl-	Dodecanoyl-	H-
B'9++)	0.4	$C_{36}H_{56}O_8$	Butyryl-	Dodecanoyl-	H-

+) R_f-Werte lt. HECKER (130)

++) partialhydrolysierte Phorboltriester

1.1. Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie verwendeten wir bei der Entwicklung der HPLC-Methode zur Zuordnung der Peaks. Von verschiedenen getesteten Laufmitteln erwies sich das schon von HECKER (184) vorgeschlagene Gemisch aus Dichlormethan-Aceton (3:1) als am besten für die Trennung von Crotonharz geeignet. Für die lipophilen Komponenten verwendeten wir Chloroform-Ether (95:5). Die Detektion erfolgte bei 254 nm im UV (Fluoreszenzminderung) und durch Besprühen mit 60%iger Schwefelsäure, womit sich die Phorbolester nach dem Erhitzen rötlichbraun anfärben.

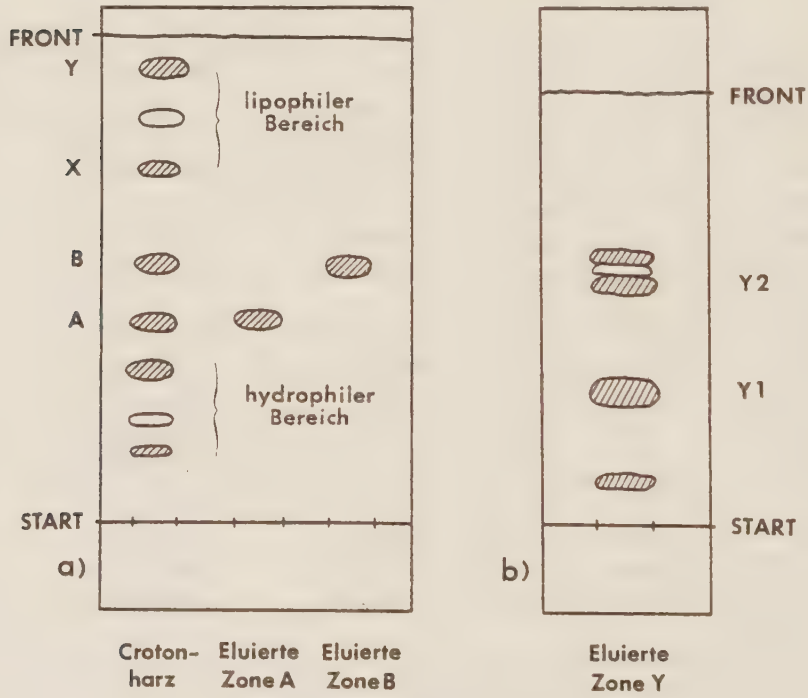


Abb. 55

DC-Trennung von Crotonharz auf Kieselgel-HPTLC-Fertigplatten
a) LM: Dichlormethan-Aceton 3:1
b) LM: Chloroform-Diethylether 95:5
Detektion: 60%ige Schwefelsäure (▨ = rötlichbraun)

Die getrennten Zonen stellen noch Estergemische dar (184). Auch durch Verwendung von HPTLC-Platten konnte keine weitere Auftrennung erreicht werden, obwohl insgesamt schärfere Zonen erhalten wurden. Die zwei Hauptzonen, die praktisch das gesamte toxische und cocarcinogene Wirkprinzip des Crotonöles beinhalten, wurden von HECKER (184) mit A und B bezeichnet, wobei die Phorboldiester der Gruppe A die langkettige Fettsäure an C-12, jene der Gruppe B an C-13 gebunden haben. Außer diesen konnten wir drei weitere Zonen von geringerer Konzentration und eine intensive Zone an der Front detektieren, die sich ebenso anfärben ließen.

Die DC eignet sich somit nur zur Auftrennung in Phorbolesterfraktionen, nicht aber zur Reinheitsprüfung und Identifizierung einzelner Ester.

1.2. Analytische HPLC von Crotonharz

Aufgrund des polaren Charakters der Phorbolester und wegen ihrer Labilität auf Kieselgel verwendeten wir für die HPLC-Trennung eine C18-Umkehrphase. Eine Trennung auf Kieselgel, wie sie von anderen Autoren vorgeschlagen wurde (171), erwies sich weniger effektiv. Außerdem führen die hierzu notwendigen Alkoholanteile im Fließmittel durch ihren Wassergehalt zu einer schnellen Inaktivierung der Säule.

Anfängliche Versuche in isokratischer Arbeitsweise mit Methanol-Wasser-Mischungen und C18-Umkehrphasen führten zu keinem befriedigenden Ergebnis. Wegen des großen Polaritätsbereiches der im Crotonharz enthaltenen Substanzen gelang immer nur die Auftrennung eines Teiles der Ester. Der andere Teil wurde entweder gleich zu Beginn der Analyse eluiert oder blieb auf der Säule. Das Problem ließ sich nur durch Gradientenelution lösen. Von verschiedenen getesteten Systemen war ein Acetonitril-Wasser-Gradient von 20% Acetonitril in 72 min auf 100% Acetonitril als einziger in der Lage, Crotonharz befriedigend aufzutrennen.

Da Phorbolester in der Regel ein Absorptionsmaximum bei 235 nm besitzen (129), Desoxyphorbolester und Ingenolderivate jedoch nur bei geringeren Wellenlängen stärker absorbieren (185), wurde zur Erfassung aller drei Stoffgruppen die Detektionswellenlänge 220 nm gewählt.

Die HPLC-Trennung von Crotonharz unter diesen chromatographischen Bedingungen ist in Abb. 56, S. 127, wiedergegeben. Sie macht die komplexe Zusammensetzung von Crotonharz deutlich. Gegenüber der DC ist die Trennleistung deutlich verbessert. Der Gradient bewirkt, daß alle Substanzen von der Säule eluiert werden und am Ende der Trennung eine stabile Grundlinie erscheint. Das polare unveresterte Phorbol fällt in diesem System mit dem Lösungsmittelpeak zusammen. Diese Trennung ist also nur für Ester geeignet.

Die Identifizierung der Phorbolester erfolgte nach ihrer Isolierung über das Massenspektrum sowie durch Fettsäureanalyse mit GC. Phorbolmyristatacetat stand als Vergleichssubstanz zur Verfügung. Anhand der identifizierten Phorbolester konnten wir feststellen, daß die HPLC-Trennung selektiv nach der Länge der Säurereste erfolgt. Bei gleichem Grundalkohol richtet sich die Elutionsreihenfolge daher nach dem Molekulargewicht. Damit hat die C-18-Umkehrphase eine völlig andere Selektivität als Kieselgel, bei dem die Stellung der langkettigen Säure, nicht aber ihre Länge entscheidend ist (130). Andererseits lassen sich Strukturisomere, die in der Kieselgel-DC trennbar sind, folglich in diesem HPLC-System nicht trennen.

Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Trennleistungen der verwendeten DC- und HPLC-Systeme zeigt Abb. 57, S. 128, die HPLC-Trennung der durch präparative Schichtchromatographie isolierten Zonen A und B. Beide Zonen werden jeweils in mehrere Peaks aufgetrennt, wobei zu sehen ist, daß zum Teil in beiden Chromatogrammen Peaks mit der gleichen Retentionszeit vorkommen. In diesen Fällen handelt es sich um Isomerenpaare. Weiter ist ersichtlich, daß beide Chromatogramme kaum Substanzen mit Retentionszeiten kleiner als

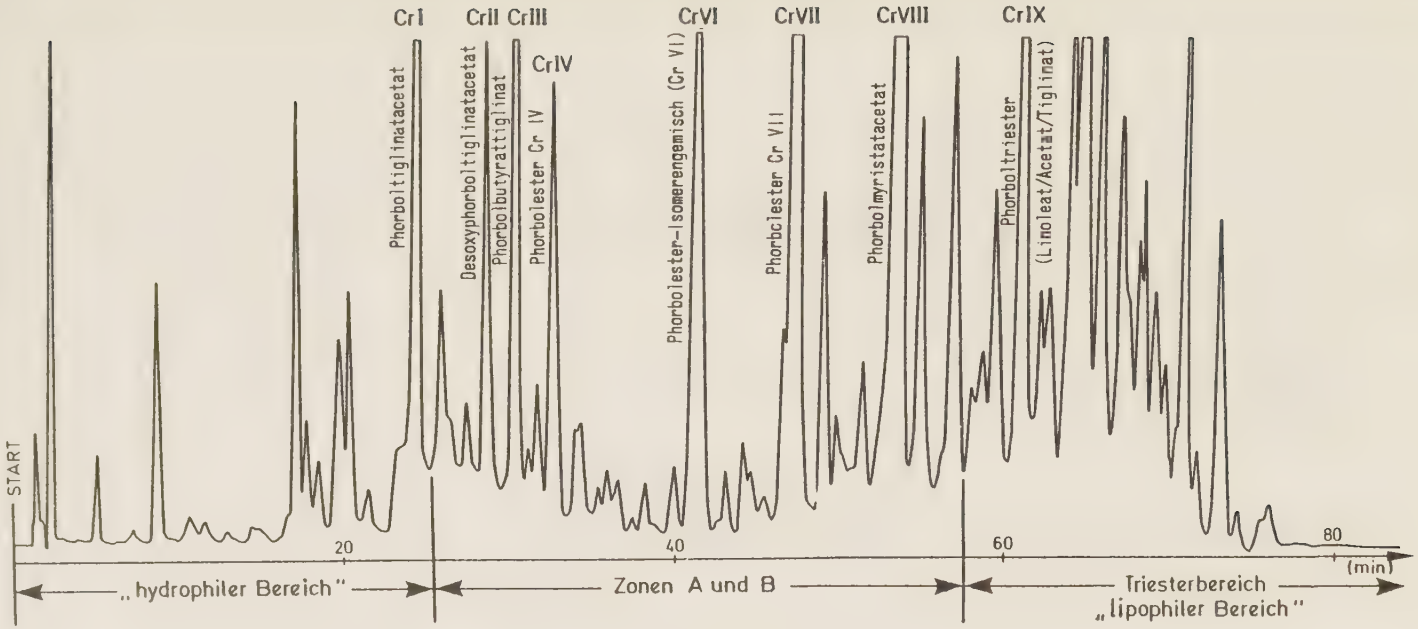


Abb. 56

HPLC-Trennung von Crotonharz (Trennsystem TS 11)

Säule: µ-Bondapak^{R}C18 (300 x 4 mm ID)

Fließmittel: A: 20%iges Acetonitril B: 100%iges Acetonitril

Gradient: von 0% B linear in 72 min auf 100% B

Durchfluß: 2 ml/min

Detektion: 220 nm/range 0.16

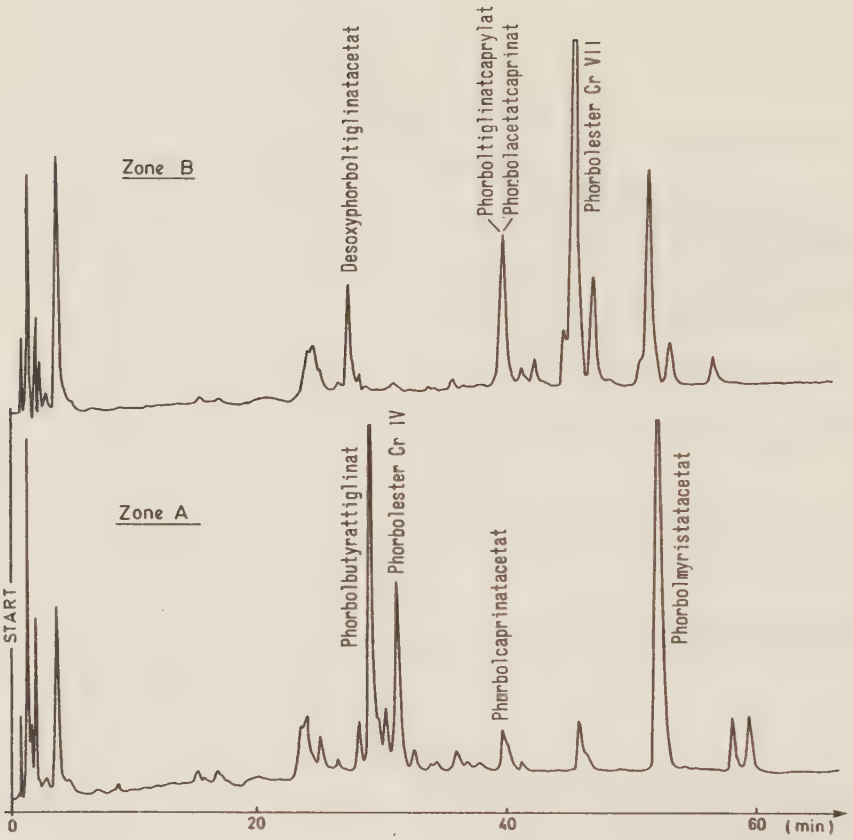


Abb. 57

HPLC-Trennung der eluierten Zonen A und B
(Trennsystem TS 11; vgl. Abb. 56, S. 127)

25 min enthalten. Diese Peaks der Crotonharztrennung (Abb. 56) gehören also zum hydrophilen Bereich der DC-Trennung (vgl. Abb. 55, S. 124). Dagegen sind die Peaks mit Retentionszeiten größer als 58 min den beiden Zonen X und Y des lipophilen Bereiches der DC-Trennung zuzuordnen.

1.3. Präparative HPLC der Phorbolester

Zur Isolierung und Identifizierung der einzelnen Phorbolester wurde Crotonharz zunächst mit einer präparativen HPLC-Säule (55 x 2.5 cm ID) vorfraktioniert. Als stationäre Phase verwendeten wir in Anlehnung an die analytische Trennung C18-Umkehrphasenmaterial. In der mobilen Phase wurde das relativ toxische Acetonitril durch Methanol ersetzt. Der wegen der geringeren Elutionskraft von Methanol notwendige höhere Methanolgehalt in der mobilen Phase erleichtert wesentlich die spätere Aufarbeitung der Fraktionen.

Die präparative HPLC-Trennung erfolgte mit einem Drei-Stufen-Gradienten mit zunächst 66.6% Methanol, später 80% Methanol und schließlich 100% Methanol. Dadurch erreichten wir, daß alle Phorbolester von der Säule eluiert wurden. Da diese im Crotonharz in der Regel in Konzentrationen von weniger als 1% enthalten sind, wurde nicht mit dem Refraktometer, sondern mit einem Spektralphotometer detektiert. Die präparative HPLC-Trennung ist in Abb. 58, S. 130, wiedergegeben. In zwei Durchgängen wurden jeweils 500 mg Crotonharz aufgetrennt. Die Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer bei 40°C soweit eingeengt, bis eine wässrige Lösung verblieb, die anschließend gefriergetrocknet werden konnte.

Die Fraktionen wurden mit DC und HPLC analytisch überprüft (vgl. Abb. 58, S. 130). Es zeigte sich, daß die Fraktionen 1 und 2, 5 und 6, 8 und 9 sowie 10 und 11 vereinigt werden konnten. Die Hauptverbindungen waren jeweils deutlich angereichert, doch enthielten sie noch mehrere andere Komponenten als Verunreinigungen, weshalb sie einer weiteren semipräparativen Reinigung unterzogen werden mußten.

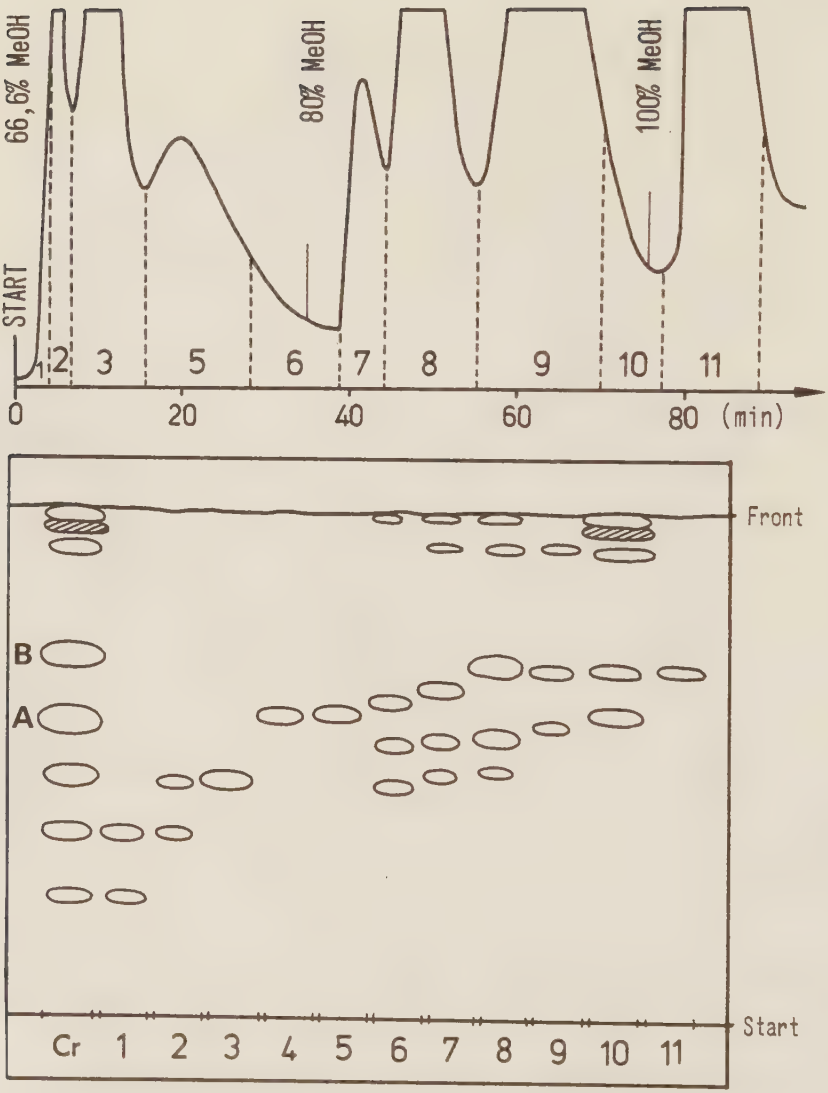


Abb. 58

Präparative HPLC-Trennung von Crotonharz (PTS 6; vgl. Exp.Teil) und DC (Dichlormethan-Aceton 3:1) der isolierten Fraktionen 1 bis 11 (Cr = Crotonharz)

○ = Fluoreszenzminderung im UV 254 nm

▨ = blaue Fluoreszenz im UV 365 nm

1.4. Semipräparative HPLC der Phorbolester

Die Reinigung der Phorbolester wurde mit einer semipräparativen HPLC-Säule (μ-Bondapak^{R}C18) durchgeführt. Je nach Polarität der Fraktion wurden als mobile Phase verschiedene Methanol-Wasser-Mischungen in isokratischer Arbeitsweise verwendet. Die Phorbolester wurden entsprechend dem Detektorsignal fraktioniert.

Auf diese Weise konnten drei Hauptverbindungen (Cr I, Cr III und Cr VIII) im Milligrammaßstab rein dargestellt werden. Cr II, Cr VI und Cr VII waren zwar nach HPLC rein, enthielten aber lt. DC jeweils noch eine Spur von Zone A bzw. B. Dies werteten wir als Hinweis, daß es sich um Isomerenpaare handeln mußte (vgl.Abschn. V.1.1.,S.124 u. V.1.2.,S.125), wie sie bereits von HECKER (130) beschrieben worden waren. Cr IV konnte nur angereichert werden. Zur Reindarstellung von Cr IX wurde zunächst die Zone Y1 (vgl. Abb. 55, S. 124) mit präparativer Schichtchromatographie (Chloroform-Ether 95:5) aus Crotonharz isoliert und diese dann mit semipräparativer HPLC gereinigt. Das Dünnschichtchromatogramm der isolierten Verbindungen ist in Abb. 59, S. 132, wiedergegeben.

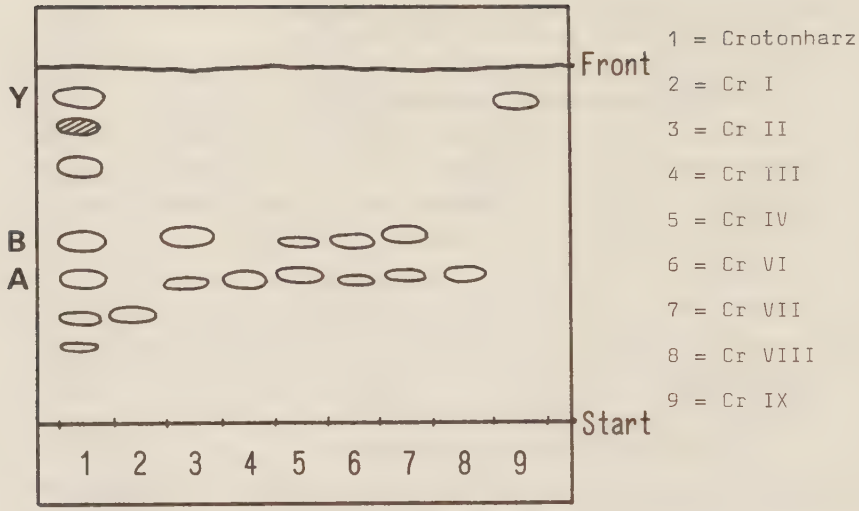


Abb. 59

HPTLC-Trennung von Crotonharz und den daraus isolierten Substanzen (LM: Dichlormethan-Aceton 3:1)

○ = Fluoreszenzminderung im UV 254 nm

▨ = blaue Fluoreszenz im UV 365 nm

1.5. Identifizierung der isolierten Verbindungen

1.5.1. Gaschromatographische Bestimmung der Säuren

Die Ester wurden im Mikromaßstab hydrolysiert und die Fettsäuren mit Bortrifluorid/Methanol in die leichter verdampfbaren Methylester überführt. Wir verwendeten hierfür eine Vorschrift nach VAN WIJNGAARDEN (186), bei der Hydrolyse und Veresterung in einem Arbeitsgang durchgeführt werden.

Die Fettsäuremethylester wurden gaschromatographisch auf einer OV101 fused silica Kapillarsäule mit einem Temperaturprogramm von 60° auf 270°C getrennt (vgl.Abb.60, S. 133).

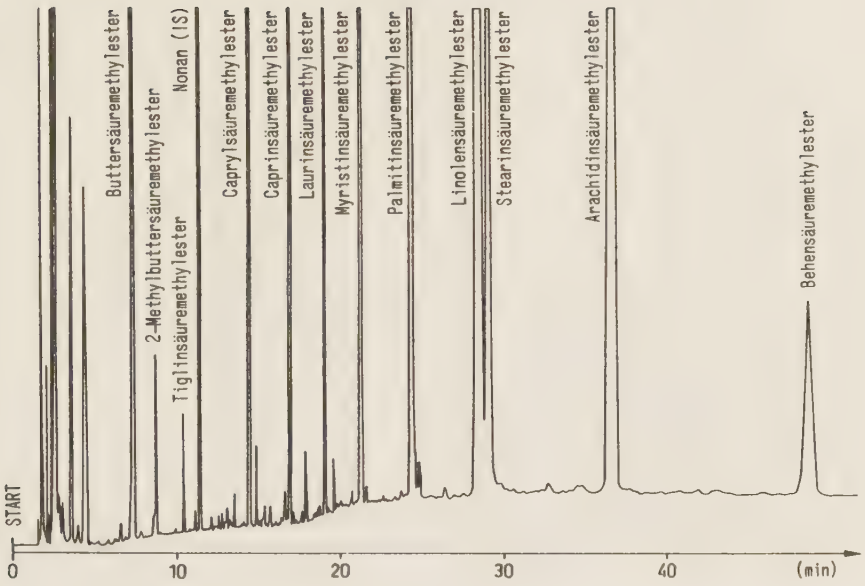


Abb. 60

Kapillargaschromatogramm einer Fettsäuremethylestertestmischung mit Nonan als Innerem Standard (IS) (Chromatographische Parameter siehe Exp.Teil)

Die Identifizierung erfolgte über die relativen Retentionszeiten (bezogen auf Nonan) durch Vergleich mit Referenzsubstanzen. Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure fielen in diesem Trennsystem allerdings in einen Peak zusammen. Für ihre Unterscheidung wurde eine Carbowax^{R}20M Kapillarsäule verwendet (vgl. Abb. 61, S. 134). Wir konnten auf diese Weise bei den isolierten Verbindungen die in Tabelle 13, S. 134, aufgelisteten Säuren nachweisen.

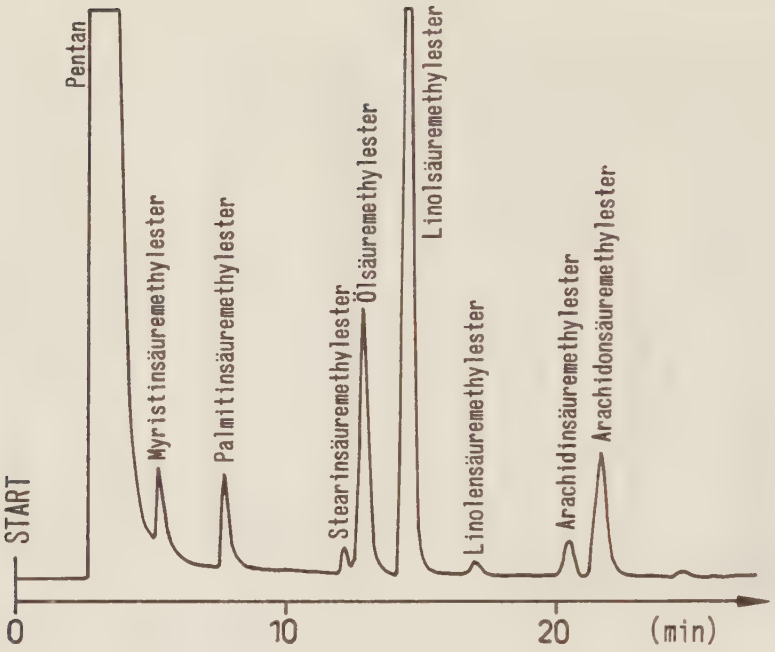


Abb. 61

Trennung von Fettsäuremethylestern auf einer Carbowax^{R} 20M-Kapillarsäule (Chromatographische Parameter siehe Exp. Teil)

Tabelle 13: Mit Gaschromatographie nachgewiesene Säuren

Substanz	Säure
Cr I	Tiglinsäure
Cr II	Tiglinsäure,(Caprinsäure ?)
Cr III	Tiglinsäure
Cr VI	Tiglinsäure, Caprinsäure, Caprylsäure
Cr VII	Tiglinsäure, Caprinsäure, Laurinsäure, Myristinsäure
Cr VIII	Myristinsäure
Cr IX	Tiglinsäure, Linolsäure

Bei Cr VI und Cr VII handelte es sich demnach vermutlich um Estergemische, da wir drei bzw. vier Säuren detektieren konnten. Der GC-Nachweis der kurzkettigen Säuren (Essigsäure und Buttersäure) gelang nicht, da zum einen die entsprechenden Methylester bei der Extraktion mit Pentan nur zu einem geringen Teil erfaßt werden, und zum anderen die entsprechenden Peaks im GC mit Peaks der Blindprobe zusammenfielen, so daß eine sichere Identifizierung ohne MS nicht möglich war.

Unter den gleichen Bedingungen wurde auch die Fettsäurezusammensetzung im Crotonöl und Crotonharz untersucht. Wir konnten in beiden Fällen folgende Säuren nachweisen: 2-Methylbuttersäure, Tiglinsäure, Caprylsäure, Caprinsäure, Laurinsäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure, Arachidinsäure und Arachidonsäure. Beim Crotonharz war die Konzentration an C18- und C20-Säuren etwas geringer als beim Crotonöl, da diese bei der Ausschüttelung mit Methanol vermutlich weniger erfaßt werden. Zusätzlich zu den von FLASCHENTRÄGER und v.WOLFFERSDORFF (187) angegebenen Säuren, konnten wir damit im Crotonöl erstmals Linolensäure und Arachidinsäure nachweisen.

1.5.2. Massenspektrometrie (MS) der Phorbolester

Da die üblicherweise verwendete EI-MS bei Phorbolestern nur sehr schwache M^+-Signale liefert (131), versuchten wir die DCI-MS (113,188) zur Molekülmassenbestimmung. Der Vorteil der DCI-MS gegenüber der schon früher bei Phorbolestern verwendeten FD-MS (189) lag darin, daß hiermit sowohl ausgeprägte Molekülpeaks als auch charakteristische Fragmentierungen erhalten wurden. Nach HECKER (130) ist das Auftreten der Fragmentionen m/z 328, m/z 310 und m/z 292 typisch für Phorbolester. Sie entstehen durch Wasser- und Fettsäureabspaltung aus den Estern. Für Desoxyphorbolester ist entsprechend die Fragmentierung m/z 312 / 294 charakteristisch (163). Mit diesen Fragmentierungsmustern stellten wir das Vorliegen der Phorbol- bzw. Desoxyphorbolgrundkörper fest. Der Molekülpeak und das Fragmentmuster oberhalb m/z 330 gaben Hinweise auf Zahl

und Länge der vorliegenden Säuren. Abb. 62 zeigt das Fragmentierungsschema der Phorbolester, welches wir mit der DCI-MS-Methode (Reaktantgas: Isobutan) beobachteten.

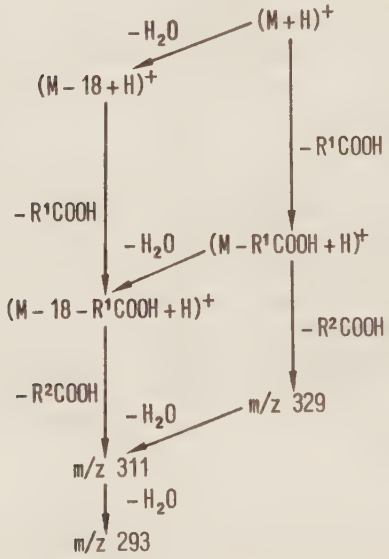


Abb. 62

Fragmentierungsschema der Phorbolester bei der DCI-MS (Reaktantgas: Isobutan)

R^1 = langkettiger Säurerest
R^2 = kurzkettiger Säurerest

Durch Protonenübertragung entsteht bei der Chemischen Ionisierung ein $(M+H)^+$-Molekülion und dementsprechend die $(Fragment+H)^+$-Ionen. Die Säuren wurden immer als RCOOH abgespalten. Abb. 63, S. 137, gibt als repräsentatives Beispiel das DCI-MS von Cr I wieder. Deutlich ist der Molekülpeak $(M+1)^+$ bei m/z 489 zu erkennen. Der Peak

bei m/z 471 resultiert aus einer Wasserabspaltung. Die Signale bei m/z 389 bzw. 371 entstehen daraus durch Verlust von Tiglinsäure (-100), die selbst den Basispeak (m/z 100) darstellt. Die Abspaltung weiterer 60 Masseneinheiten (Essigsäure) führt zum Phorbolgrundalkohol (m/z 329), der weiter nach m/z 311 und m/z 293 fragmentiert.

Damit handelt es sich bei Cr I um Phorboltiglinatacetat, das bisher noch nicht im Crotonöl beschrieben wurde.

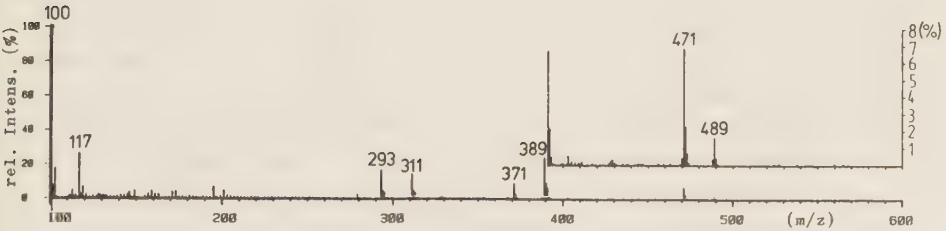


Abb. 63

DCI-Massenspektrum von Cr I (Reaktantgas: Isobutan)

Das DCI-Massenspektrum von Cr II wies die für Desoxyphorbolester typischen Fragmente bei m/z 313 und 295 auf. Der Molekülpeak $(M+1)^+$ bei m/z 473 und die Fragmente bei m/z 455, m/z 373 und m/z 355 deuteten wieder auf Tiglinat und Acetat als Estergruppen. Demnach stellt Cr II Desoxyphorboltiglinatacetat dar. Von HECKER (133) wurde bereits über einen Gehalt von 0.29% 4-Desoxyphorbolestern im Crotonöl sowie über die Isolierung entsprechender Diester (190) berichtet. Speziell dieser Ester wurde aber bisher noch nicht gefunden.

Die Substanz Cr III stellt nach dem DCI-Massenspektrum (Abb. 64, S. 138) Phorbolbutyrattiglinat dar.

Abb. 64

DCI-Massenspektrum von Cr III (Reaktantgas: Isobutan)

Da Cr III bei der DC auf die Höhe der Zone A läuft (vgl. Abb. 59, S. 132) sollte die Tiglinsäure am C-12 gebunden sein, und es könnte sich um 12-O-Tiglyl-phorbol-13-butyrat handeln, das bereits von SCHMIDT und HECKER (191) durch Partialhydrolyse aus einem Phorboltriester aus Crotonöl erhalten und mit A'5 bezeichnet worden war. Über das genuine Vorkommen im Crotonöl ist bisher nicht berichtet worden.

Die Substanz Cr VI bestand nach der DC (Abb. 59) noch aus mindestens zwei Verbindungen. Im HPLC-Trennsystem für Crotonharz zeigte sich aber nur ein Peak. Durch Verwendung einer von uns mit einer C2/C8-Mischphase gepackten analytischen Säule konnten wir Cr VI auch mit HPLC auftrennen (vgl. Abb. 65, S. 139). Es waren drei Verbindungen zu erkennen.

Im DCI-Massenspektrum (Abb. 66, S. 140) zeigten sich parallel zwei Fragmentierungen ausgehend von Molekülionen $(M+1)^+$ bei m/z 573 und m/z 561. In einem Fall (m/z 573) werden nacheinander Caprylsäure (-144), Tiglinsäure (-100) und Wasser (-18), im anderen Fall (m/z 561) Caprinsäure (-172), Essigsäure (-60) und Wasser abgespalten.

Abb. 65

HPLC-Trennung von Cr VI

Detektion: 220 nm/range 0.16

I: Säule: μ-Bondapak^{R}C18 (300 x 4 mm ID)
Fließmittel: TS 11 (vgl.Abb.56, S. 127)

II: Säule: LiChrosorb^{R}-RP2/RP8(1:1)-Mischphase (300 x 4 mm ID)
Fließmittel: 70% Methanol
Flow: 2 ml/min

Es handelt sich somit bei Cr VI um eine Mischung aus Phorboltiglinatcaprylat (MG 572) und Phorbolacetatcaprinat (MG 560), die bereits von CLARKE und HECKER (192) aus Crotonöl isoliert und mit B6 (12-O-Tiglyl-phorbol-13-caprylat) bzw. B7 (12-O-Acetyl-phorbol-13-caprinat) bezeichnet wurden. Da Cr VI bei der DC (vgl. Abb. 59, S. 132) auch noch eine Zone auf der Höhe der Estergruppe A aufweist, könnte es sich bei der dritten Komponente in Cr VI um A2 (12-O-Decanoyl-phorbol-13-acetat) (130), die stellungsisomere Verbindung von B7 handeln.

Das DCI-Massenspektrum von Cr VIII stimmte voll mit dem von 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) überein, das als Referenzsubstanz zur Verfügung stand. TPA wurde erstmals von HECKER und BRESCH (193) aus Crotonöl isoliert.

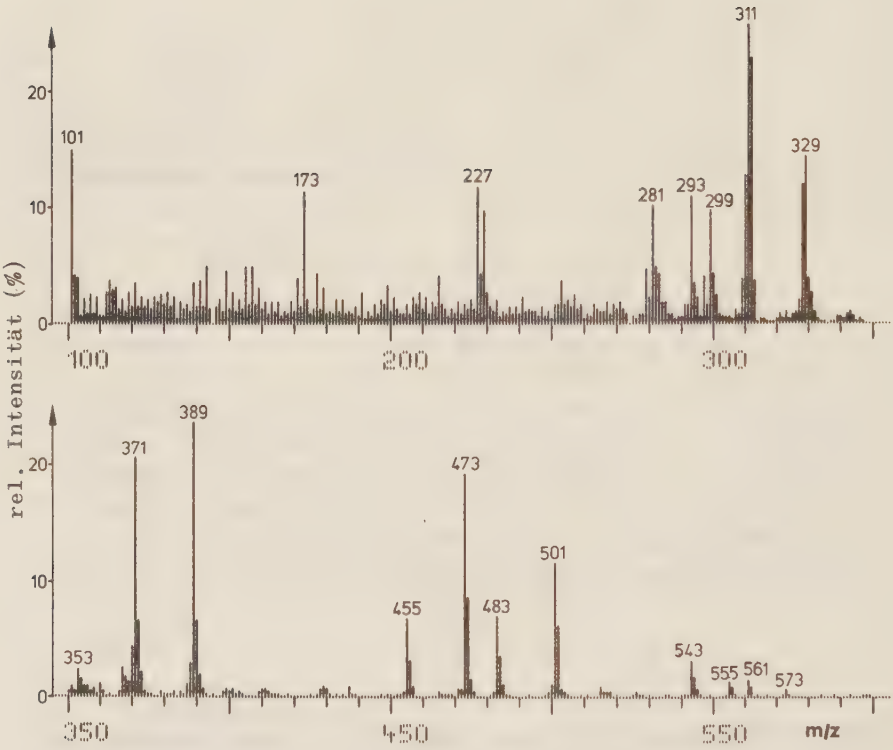


Abb. 66

DCI-Massenspektrum von Cr VI (Reaktantgas: Isobutan)

Im DCI-MS von Cr IX trat bei m/z 751 die größte Masse auf. Wir interpretierten dieses Fragment als $(M-18+1)^+$. Durch Abspaltung von Tiglinsäure (-100) entstand ein Ion mit m/z 651, durch weitere Abspaltung von Linolsäure (-280) m/z 371 und durch Verlust von Essigsäure (-60) m/z 311, das dem Phorbolgrundalkohol entspricht. Damit dürfte es sich bei Cr IX in Übereinstimmung mit der Fettsäurehydrolyse um Phorbollinoleattiglinatacetat handeln.

Phorboltriester wurden auch schon von HECKER (130) im Crotonöl nachgewiesen. Er konnte diese Ester allerdings nur über die durch Partialhydrolyse entstehenden Diester charakterisieren. Cr IX ist der erste im Crotonöl aufgefundene Phorbolester mit einer ungesättigten Säure. Aus anderen Euphorbiaceen sind bereits mehrfach entsprechende Ester isoliert worden (132).

Cr IV, Cr V und Cr VII konnten nicht eindeutig identifiziert werden, da es sich noch um Gemische handelte. In allen drei Fällen ließ sich im Massenspektrum der Phorbolgrundalkohol identifizieren. Bei Cr VII konnten wir mit MS Essigsäure und Caprinsäure nachweisen. Allerdings erhielten wir keinen Molekülpeak. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Zuordnung zusammengefaßt.

Tabelle 14: Mittels HPLC isolierte Substanzen

	RRt.+)	R_f++)	Zuordnung
Cr I	0.46	0.3	Phorboltiglinatacetat
Cr II	0.53	0.5	Desoxyphorboltiglinatacetat
Cr III	0.57	0.4	Phorbolbutyrattiglinat
Cr IV	0.61	0.4/0.5	nicht identifizierte Phorbolester
Cr V	0.63	0.4/0.5	nicht identifizierte Phorbolester
Cr VI	0.78	0.4/0.5	Phorbolcaprinatacetat und Phorbolcaprylattiglinat
Cr VII	0.89	0.4/0.5	nicht identifizierte Phorbolester
Cr VIII	1.00	0.4	Phorbolmyristatacetat
Cr IX	1.15	0.9	Phorbollinoleattiglinatacetat

+) Relative Retentionszeit bezogen auf Phorbolmyristatacetat im Crotonharz-HPLC-System (TS 11)

++) R_f-Werte mit Kieselgel-HPTLC-Platten; LM: Dichlormethan-Aceton 3:1 (vgl. Abb. 59, S. 132)

2. HPLC-Trennung von Croton tiglium Urtinktur

In dem von uns für Crotonharz beschriebenen HPLC-System (TS 11) gelang auch die Auftrennung der Phorbolester der Croton tiglium Urtinktur, die durch Mazeration der pulverisierten reifen Samen mit 90%igem Weingeist nach § 4, HAB 1934, hergestellt wird. Die Urtinktur wurde mit HPLC ohne weitere Aufarbeitung direkt analysiert. In diesem System resultierte allerdings eine sehr lange Analysenzeit (80 min), wobei in den ersten 20 min kaum Peaks auftraten. Wir optimierten das HPLC-Trennsystem deshalb dahingehend, daß wir eine kürzere Säule (LiChrosorb^{R}RP18, 125-4) mit 5 µ-Material, sowie 45%iges Acetonitril als Fließmittel A verwendeten. Die entsprechende Trennung ist in Abb. 67 wiedergegeben.

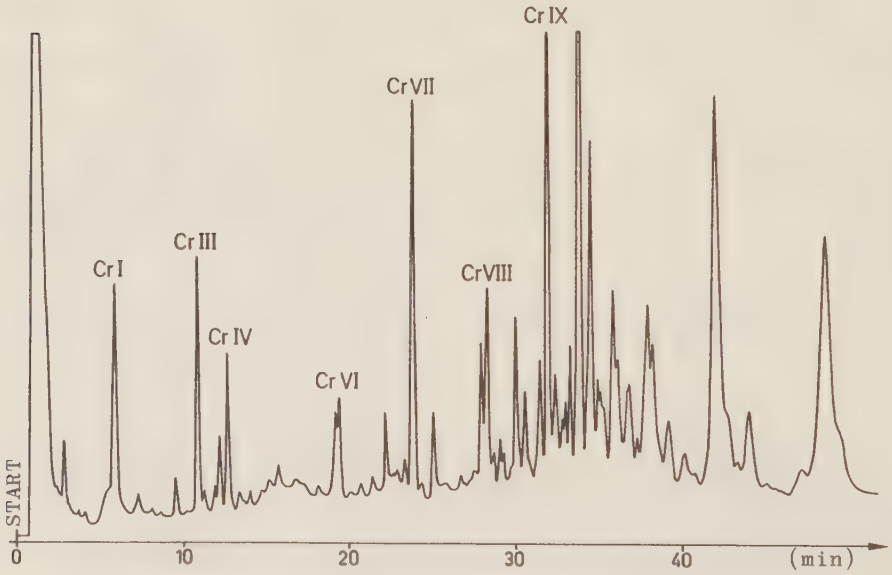


Abb. 67

HPLC-Trennung von Croton tiglium Urtinktur im Trennsystem TS 13 (vgl.Exp.Teil)

Man erkennt deutlich, daß die Peaks im lipophilen Bereich (Rt. ab 30 min) dominieren. Dabei handelt es sich vermutlich in der Hauptsache um Triester des Phorbols, die als sogenannte "kryptische" Cocarcinogene ihre volle biologische Aktivität erst nach Partialhydrolyse zu den Diestern entfalten (130). Eine Standardisierung entsprechender Präparate kann über diesen HPLC-Fingerprint erfolgen. Die quantitative Auswertung mit einem Externen Standard ist möglich, da Phorbolmyristatacetat (Cr VIII) käuflich erhältlich ist und als Referenzsubstanz dienen kann.

3. HPLC-Analyse von Diterpenestern in verschiedenen Pflanzenextrakten

3.1. Extraktbereitung

Um die bei der Analyse von Crotonöl erprobte HPLC-Methode auch auf andere tiglian-, ingenan- oder daphnanesterhaltige Pflanzen zu übertragen und für ein Diterpenesterscreening bei Euphorbiaceen-Pflanzen einsetzen zu können, mußten zunächst einige Anreicherungsschritte durchgeführt werden.

Geht man vom Milchsaft der Pflanzen aus, so hat sich zur Probenvorbereitung die Extraktionsmethode von EVANS (131) bewährt (vgl. Abb. 68, S. 144): Der Acetonextrakt des Latex-Trockenrückstandes wird nach dem Einengen zur Trockne in Methanol-Wasser suspendiert und anschließend durch Ausschüttelung mit Hexan von Lipoiden und Triterpenoiden befreit. Die Diterpenester lassen sich dann mit Ether ausschütteln, wobei aus der Etherphase durch Verteilung mit wässriger Natriumcarbonatlösung Pflanzensäuren und phenolische Verbindungen abgetrennt werden können. Der Etherextrakt kann für die HPLC-Analyse und -Isolierung verwendet werden. Nach diesem Verfahren haben wir z.B. den Latex von Euphorbia canariensis L. aufgearbeitet.

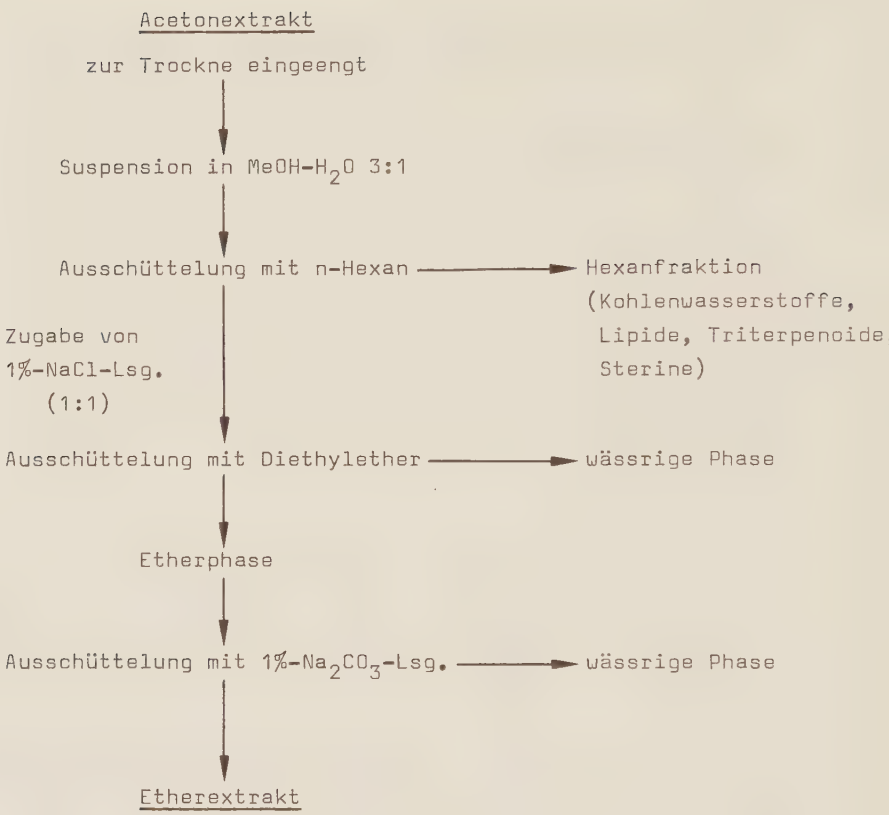


Abb. 68

Extraktionsschema für Diterpenester nach EVANS (131)

Beim Vorliegen von Frischdrogen mit geringem Latexgehalt, wie beispielsweise Euphorbia cyparissias L., hat sich eine Acetonextraktion am Sorvall^{R}Omnimix als geeignet erwiesen. Die weitere Anreicherung der Diterpenester folgt dem Schema in Abb. 68. Es muß hierbei aber bei der Ausschüttelung mit Hexan auf eine möglichst vollständige Abtrennung von Chlorophyll

und anderer lipophiler Substanzen geachtet werden, da diese die Lebensdauer der HPLC-Säule vermindern. Ebenso sollten Flavonoide und alle übrigen phenolischen Verbindungen durch eine abschließende Ausschüttelung mit Natriumcarbonatlösung weitestgehend abgetrennt werden, da diese bei der HPLC eine verstärkte Untergrundabsorption bewirken.

Das oben Gesagte gilt auch für die Extraktion von Pulverdrogen, die am schonendsten durch Mazeration erfolgt. Bei getrockneter Droge muß allerdings damit gerechnet werden, daß die Ester bereits ganz oder teilweise abgebaut sind. So konnten wir zwar im Pulver von Mezerei cortex Diterpenester nachweisen, nicht aber in der getrockneten und pulverisierten Droge von Euphorbia canariensis.

3.2. HPLC-Trennung der Extrakte

Euphorbia canariensis L.

Der Saft von Euphorbia canariensis wird in der Volksmedizin gegen Geschwüre verwendet (151). Ein aus E.canariensis-Latex bereiteter Extrakt trennte sich mit dem für Crotonharz beschriebenen HPLC-Trennsystem in fünf Hauptverbindungen. Durch Verringerung der Gradientenlaufzeit auf 30 min gelang es uns, die Analysenzeit wesentlich zu verkürzen (siehe Abb. 69, S. 146). Nach den parallel durchgeführten DC-Untersuchungen (Abb. 70, S. 146) handelt es sich bei den Inhaltsstoffen um Ingenolester. Die Hauptkomponente E I wies bei der DC (LM: Dichlormethan-Aceton 3:1) nach Detektion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure die gleiche blaugraue Färbung wie Ingenol-3-angelat auf und hatte nur einen unwesentlich höheren R_f-Wert als dieses. Der Vergleich der beiden Substanzen mit HPLC ergab, daß E I nur zwei Minuten später eluiert wurde als Ingenolangelat. Wir vermuten daher, ebenso wie EVANS und SOPER (131), Ingenanabkömmlinge als Inhaltsstoffe. Eine Isolierung scheint mit HPLC möglich.

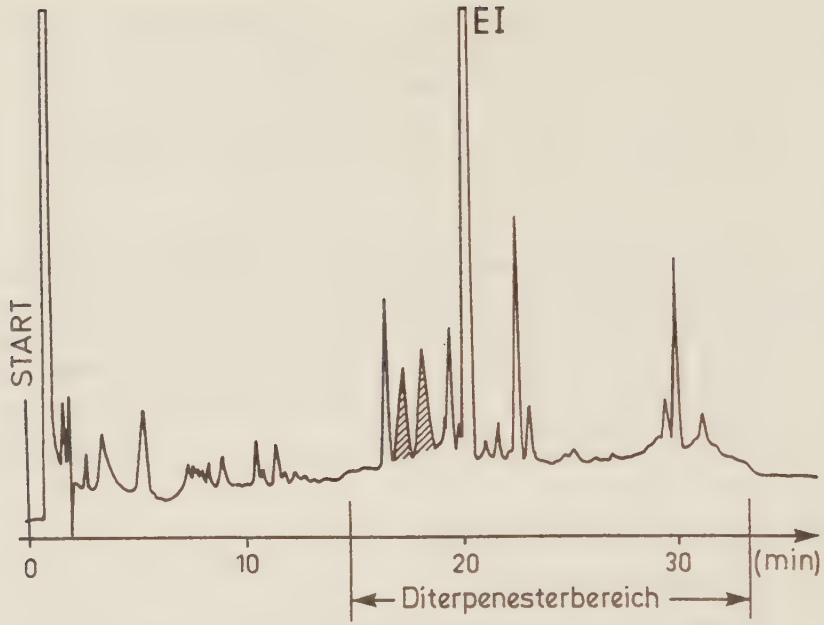


Abb. 69

HPLC-Trennung eines Extraktes aus Euphorbia canariensis-Latex (Trennsystem TS 14; vgl.Exp.Teil) Bei den schraffierten Peaks handelt es sich um Verunreinigungen des Acetonitrils.

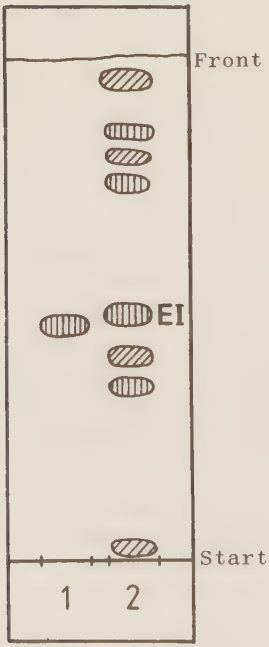


Abb. 70

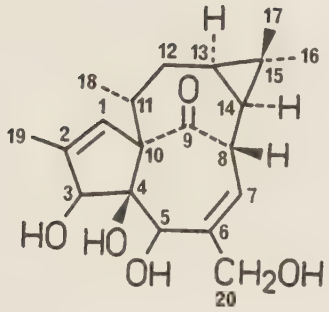
DC-Trennung des Extraktes aus Euphorbia canariensis-Latex (2) und Vergleich mit Ingenol-3-angelat (1)

LM: Dichlormethan-Aceton 3:1

Det.: Anisaldehyd/Schwefelsäure

= blaugrau im vis

= violett im vis



Ingenol

Euphorbia cyparissias L.

Die Zypressenwolfsmilch, deren Milchsaft früher als Brech- und Abführmittel sowie gegen Warzen verwendet wurde, spielt heute in der Homöopathie noch eine Rolle bei der Behandlung von Magenkrämpfen, Reizzuständen der Schleimhäute, Diarrhoe und Psoriasis (9). Von OTT und HECKER (194) wurden kürzlich aus den Wurzeln mehrere Diterpen-di- und -tri-ester des Ingenantyps isoliert, von denen drei die stärkste entzündliche Wirkung aufweisen, die bisher in dieser Klasse gefunden wurde.

Einen aus den oberirdischen Teilen der Pflanze hergestellten Extrakt konnten wir mit HPLC in sechs Hauptkomponenten und mehrere Verbindungen geringerer Konzentration auftrennen (vgl. Abb. 71, S. 148). Nach den Ergebnissen der DC (Dichlormethan-Aceton 3:1; Anisaldehyd/Schwefelsäure) handelt es sich um Ingenanderivate. Bei entsprechender Optimierung des Trennsystems scheint auch hier eine Isolierung mit HPLC möglich.

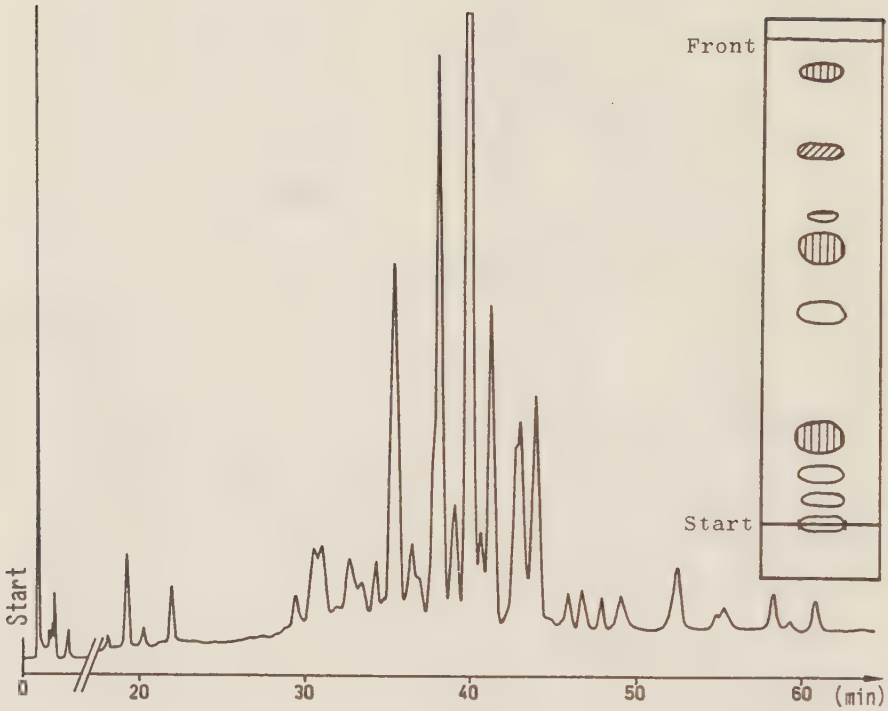


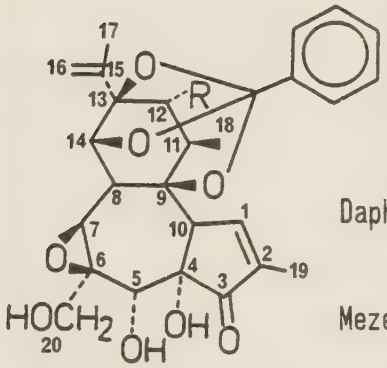
Abb. 71

HPLC-Trennung (TS 1; vgl.Exp.Teil) und Dünnschichtchromatogramm (Dichlormethan-Aceton 3:1; Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz: ▨ = blau im vis, ▨ = violett im vis) der angereicherten Diterpenester aus Euphorbia cyparissias

Daphne mezereum L.

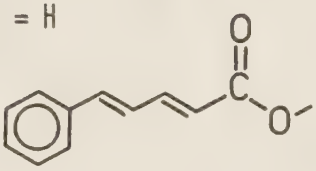
Die Rinde von Daphne mezereum L. (Thymelaeaceae) wird als blasenziehendes Mittel in Pflastern gegen Gicht und Rheuma verwendet. In der Homöopathie wird sie gegen Gürtelrose und Schleimhautentzündungen, sowie bei Neuralgien und Neuritiden eingesetzt (9). STOUT und Mitarb. (195) konnten aus der Rinde

Daphnetoxin isolieren. RONLAN und WICKBERG (196) wiesen in den Samen einen weiteren Diterpenester dieses Typs, Mezerein, neben geringen Mengen Daphnetoxin nach.



Daphnetoxin R = H

Mezerein R =



In einem durch Mazeration mit Aceton aus handelsüblicher Seidelbastrinde hergestellten und anschließend gereinigten Extrakt konnten wir durch HPLC geringe Mengen von Daphnetoxin nachweisen (Cochromatographie mit authentischem Daphnetoxin). Daneben waren aber noch eine Reihe anderer Verbindungen zu erkennen, bei denen es sich lt. DC ebenfalls um Diterpenester handeln müßte (vgl. Abb. 72, S. 150). Zur Identifizierung dieser Substanzen bietet sich auch hier die oben beschriebene präparative HPLC-Methode an.

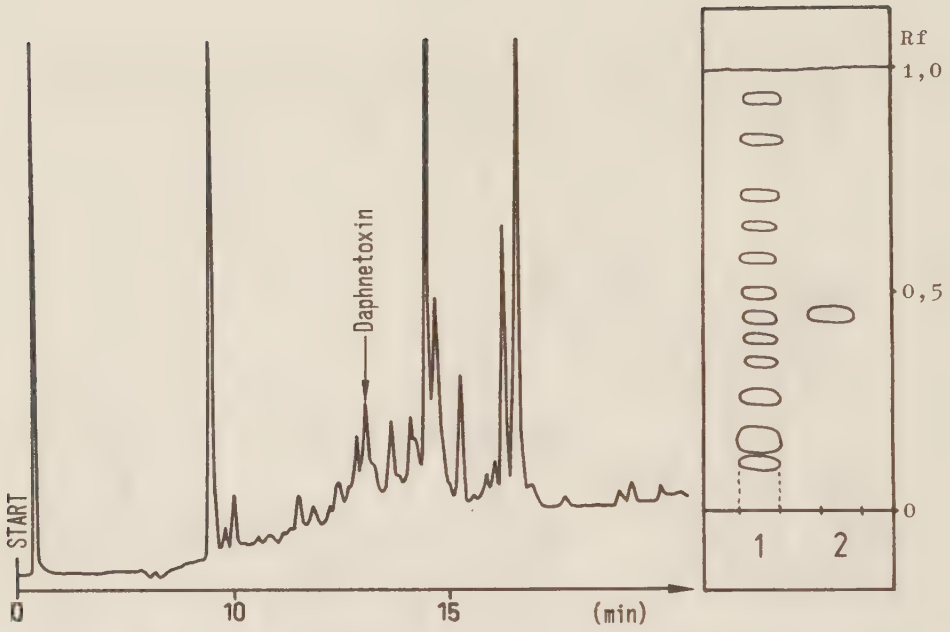


Abb. 72

HPLC- und DC-Trennung eines Extraktes aus Mezerei cortex

HPLC:	Säule:	µ-Bondapak^{R}C18 (300 x 4 mm ID)
	Fließmittel:	A: Acetonitril-Wasser 20:80
		B: Acetonitril
	Gradient:	von 0% B linear in 30 min auf 100% B
	Durchfluß:	2 ml/min
	Detektion:	220 nm/range 0.04
DC:	LM:	Dichlormethan-Aceton 3:1
	Detektion:	60%ige Schwefelsäure (rötlichbraune Zonen im vis)

1 = angereicherter Diterpenesterextrakt von Mezerei cortex
2 = Daphnetoxin

VI. Diskussion der in Kapitel 3 erhaltenen Ergebnisse

Mit dem beschriebenen HPLC-System ist es möglich, Extrakte mit Phorbol- und anderen Diterpenestern zu analysieren. Am Beispiel von Crotonöl wurde deutlich, daß im Gegensatz zur Kieselgel-DC die Phorbolester auf einer C18-Umkehrphase nach der Länge und der Zahl der Fettsäuren aufgetrennt werden. Die Stellung der langkettigen Säure spielt dabei offenbar keine Rolle. Somit können mit der HPLC die von HECKER (130) beschriebenen Estergruppen A und B weiter aufgetrennt werden. Durch Variation der Umkehrphase gelingt auch die Trennung der Strukturisomeren. Die HPLC ist daher zur Analyse der Phorbolester wesentlich besser geeignet als die DC.

Wie am Beispiel Croton tiglium Urtinktur und anhand mehrerer Extrakte aus Euphorbiaceen demonstriert werden konnte, ist die HPLC-Methode auch zur Analyse entsprechender Phytopräparate und zur Screeninganalyse einsetzbar. Sie ist hierbei der DC durch die höhere Trennleistung und die einfachere quantitative Auswertung überlegen.

Neben der qualitativen und quantitativen Analyse bietet die HPLC auch die Möglichkeit einer schnellen Isolierung von Phorbol- und verwandten Diterpenestern im halbpräparativen Maßstab. Im Vergleich zu den bisherigen Isolierungsverfahren (DC, SC, Flüssig-Flüssig-Verteilung) hat die beschriebene HPLC-Methode den Vorteil, daß in jedem Fall die genuin in der Pflanze vorkommenden Ester isoliert werden können. Eine Zersetzung, wie sie von ABO und EVANS (167) bei der Trennung von Ingenolestern auf Kieselgel beschrieben wurde, ist bei der Verwendung der lipophilen C18-Umkehrphase nicht zu befürchten. Die bessere Trennleistung ermöglicht zudem eine schnelle Isolierung in wenigen Schritten.

Ausgehend von ca. 1 g angereichertem Extrakt konnten wir aus Crotonöl eine Reihe von Tiglianestern im Mikromaßstab isolieren und mit bekannten Verfahren (131) identifizieren.

Zusätzlich zu den von den Arbeitsgruppen HECKER (130) und VAN DUUREN (134) bereits isolierten Substanzen (Phorboltiglinatcaprylat, Phorbolacetatcaprinat, Phorbolmyristatacetat) konnten folgende bisher im Crotonöl noch nicht beschriebene Ester identifiziert werden: Phorboltiglinatacetat (Cr I), Desoxyphorboltiglinatacetat (Cr II), Phorbolbutyrattiglinat (Cr III) und Phorbollinoleattiglinatacetat (Cr IX). Phorbolbutyrattiglinat (Cr III) wurde von SCHMIDT und HECKER (190) auch schon durch Partialhydrolyse aus einem Phorboltriester erhalten und mit A'5 bezeichnet. Cr I und Cr IX stammen aus dem bisher nur wenig untersuchten "hydrophilen" bzw. "lipophilen" Teil des Crotonharzes. Cr IX stellt den ersten im Crotonöl nachgewiesenen Phorbolester mit einer ungesättigten Fettsäure dar.

Z U S A M M E N F A S S U N G

I. 1. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein HPLC-Trennsystem für Cucurbitacine entwickelt werden. Durch Gradientenelution und die Verwendung einer C18-Umkehrphase werden Cucurbitacinaglykone und ihre Glykoside in einem Analysengang getrennt. Bei der vorgeschlagenen Detektionswellenlänge von 230 nm können nahezu alle Cucurbitacin-Typen erfaßt und die ubiquitär vorkommenden Sterine ausgeschlossen werden. Die hierbei erzielte Empfindlichkeit ist der bei den bekannten DC-Verfahren vergleichbar und liegt in der Größenordnung von 100 ng. Die Trennleistung der beschriebenen HPLC-Methode ist aber insgesamt größer und die Chromatogramme sind besser auswertbar.

2. Anhand verschiedener cucurbitacinhaltiger Drogen konnte eine Vorschrift erstellt werden, mit der man für jede Droge einen charakteristischen chromatographischen Cucurbitacin-Fingerprint erhält, der für eine Identitäts- und Qualitätsprüfung herangezogen werden kann.

3. Für die Beurteilung der Chromatogramme wurde die neue Photodiodenarray-Detektionstechnik eingesetzt, mit der durch die während der Analyse kontinuierlich aufgenommenen UV-Spektren Aussagen über die Peakreinheit und -identität möglich sind. Auf diese Weise wurden in den Chromatogrammen die verschiedenen Cucurbitacin-Typen unterschieden, und Nicht-Cucurbitacine mit gleichem Retentionsverhalten, z.B. Flavonoide und Anthrachinonglykoside, erkannt.

4. Die HPLC-Untersuchungen zeigten, daß die vom Homöopathischen Arzneibuch vorgeschriebenen Extraktionsarten die Cucurbitacine nicht in jedem Fall quantitativ erfassen. Andererseits ließen sich die Cucurbitacine bei "Colocynthis" sogar noch in der Verdünnung D3 ohne Anreicherung nachweisen. Auch bei einem homöopathischen Mischpräparat konnte das für Colocynthidis fructus typische Cucurbitacinmuster erhalten werden.

5. Eine bei Luffae fructus durchgeführte Cucurbitacin-Gehaltsbestimmung mittels HPLC arbeitete bei Verwendung eines Inneren Standards mit einer relativen Standardabweichung von ca. 1% und damit wesentlich genauer als vergleichbare DC-Methoden.

6. Die Untersuchung verschiedener Muster von Bryoniae radix ergab eine große Schwankungsbreite beim Gesamtgehalt (0.1% bis 0.81%) und auch beim Gehalt der einzelnen Cucurbitacine, so daß eine Abgrenzung und damit Unterscheidung zwischen Bryonia alba und B.dioica vorerst nicht möglich war.

II. 1. Aus dem Chloroformextrakt der Wurzel der südamerikanischen Cucurbitacee Cayaponia tayuya (VELL.)COGN. wurden mit HPLC insgesamt fünf Cucurbitacine isoliert und als Cucurbitacin R, 23,24-Dihydrocucurbitacin B, Cucurbitacin R-2-O-glucosid, 23,24-Dihydrocucurbitacin B-2-O-glucosid und 23,24-Dihydroisocucurbitacin B identifiziert. Chromatographisch waren außerdem Cucurbitacin B und dessen 2-O-Glucosid nachweisbar. Ein vergleichbares Cucurbitacinmuster ist bisher in keiner anderen Cucurbitaceae beschrieben worden.

2. Aus dem Ethanolextrakt der Wurzel konnten die Flavon-C-glykoside Vitexin, Isovitexin, Swertisin, Spinosin und Vicenin 2 isoliert und spektroskopisch identifiziert werden. Chromatographisch waren zusätzlich noch Orientin und Isoorientin nachweisbar. Bisher gibt es keine Hinweise auf ein ähnlich konzentriertes Auftreten von Flavonglykosiden in einer anderen Cucurbitaceenwurzel. Für Spinosin ist dies nach Zizyphus vulgaris var. spinosus (Rhamnaceae) der zweite Bericht über das Vorkommen im Pflanzenreich.

3. Für Cucurbitacin E beobachteten wir in vitro bei einer Verdünnung von 10^{-6} eine 25%ige Phagozytosesteigerung, die einen Einfluß der Cucurbitacine auf das zelluläre Immunsystem erkennen läßt.

III. 1. Zur Ausarbeitung eines HPLC-Trennsystemes für Phorbolester und verwandte Diterpenester wurde Crotonöl als Modelldroge ausgewählt. Die Auftrennung der Phorbolester auf einer C18-Umkehrphase mit einem Fließmittelgradienten aus Acetonitril/Wasser erfolgte mit einer anderen Selektivität als bei der herkömmlichen Kieselgelchromatographie. Die Trennleistung der HPLC war dadurch wesentlich größer als die der DC. Insbesondere konnten die von HECKER (130) beschriebenen Estergruppen A und B weiter aufgetrennt werden.

2. Die Verwendbarkeit der HPLC wurde an mehreren Extrakten aus diterpenesterhaltigen Drogen demonstriert. Es gelang dabei auch die Auftrennung der Ingenan- und Daphnanester; ebenso wie der Nachweis der Phorbolester in Croton tiglium Urtinktur.

3. Durch präparative HPLC konnten aus Crotonöl Milligrammmengen von Phorbolestern für eine Identifizierung isoliert werden. Diese Methode war den herkömmlichen Isolierungsverfahren durch die Schnelligkeit, die höhere Trennleistung und die schonenderen Bedingungen überlegen.

   Im Crotonöl wurden auf diese Weise, neben bereits bekannten Verbindungen, erstmals Phorboltiglinatacetat, Desoxyphorboltiglinatacetat, Phorbolbutyrattiglianat und Phorbollinoleattiglinatacetat nachgewiesen.

   Die beschriebene HPLC-Methode eröffnet damit auch die Möglichkeit, die bisher schwer zugänglichen Phorboltriester analytisch und präparativ zu erfassen.

EXPERIMENTELLER TEIL

Kapitel 1:

I. Herkunft der Drogen

Colocynthidis fructus	Fa.Galke, Gittelde/Harz (Ch.B.0356/00) Schützen-Apotheke,München (Febr.1983)
Gratiolae herba	Fa.ANZAG, Mannheim (Ch.B.122) Fa.Galke, Gittelde/Harz (Ch.B.0582/81) Schützen-Apotheke,München (Febr.1983)
Iberidis semen	Fa.Petereit,Elmshorn (Aug.1982)
Ecballii fructus	Botanischer Garten,München (Aug.1982)
Luffae fructus	Fa.Müggenburg, Hamburg (Ch.B.100402) Alsitan-Gesellschaft,München
Tayuyae radix	Fa.Celo,Zweibrücken (April 1982)
Bryoniae radix	vgl. Tabelle 15,

Tabelle 15: Herkunft der untersuchten Bryoniae radix Muster

Nr.	Art	Herkunft
1	B.indef.	Fa.CAELO,Hilden, Ch.B.401
2	B.indef.	Fa.MÜGGENBURG,Hamburg, Ch.B.233.20
3	B.alba(?)	Fa.PETEREIT,Elmshorn (31.8.82)
4	B.indef.	Fa.BRENNER,Alpirsbach, Ch.B.250/2
5	B.alba(?)	Fa.MÜGGENBURG,Hamburg, Ch.B.233.28
6	B.alba	Fa.FINZELBERG,Andernach, Ch.B.187/82A
7	B.indef.	Fa.KLENK,Schweinfurt, Ch.B.71310
8	B.indef.	Fa.KLENK,Schweinfurt, Ch.B.74010
9	B.cretica ssp. dioica	Fa.DHU,Karlsruhe (Sept.1982),(gefriergetr.)
10	B.indef.	Dr.Pohlmann,Bot.Garten Hamburg(gefriergetr. Sept.1983)
11	B.indef.	Fa.BIRKENWEG,Kleinostheim, Ch.B.610/2
12	B.indef.	Fa.BIRKENWEG,Kleinostheim, Ch.B.611/2
13	B.dioica	aus Samen gezogen, einjährig, (gefriergetr. Sept.1983)

Fortsetzung Tabelle 15 - Seite 157

Fortsetzung Tabelle 15:

Nr.	Art	Herkunft
14	B.dioica	aus Samen gezogen, einjährig, (gefriergetr. Sept.1983)
15	B.alba(?)	Dr.Pohlmann,Bot.Garten Hamburg(gefriergetr. Sept.1983)
16	B.alba(?)	Dr.Pohlmann,Bot.Garten Hamburg(gefriergetr. Sept.1983)
17	B.alba	Prof.Teppner,Bot.Garten Graz; zweijährig (gefriergetr. Sept.1983)
18	B.alba	Prof.Teppner,Bot.Garten Graz; zweijährig (gefriergetr. Sept.1983)
19	B.alba	Prof.Teppner,Bot.Garten Graz; zweijährig (gefriergetr. Sept.1983)

II. Herkunft der Vergleichssubstanzen

Cucurbitacine E und I:	Fa.Roth,Karlsruhe; Prof.Dr.D.Lavie,The Weizmann Institut of Science, Rehovot, Israel; Prof.Dr.M.Wichtl,Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Marburg/Lahn; Prof.Dr.E.T.Sneden,Virginia Commonwealth University, Richmond, USA;
Cucurbitacin B:	Prof.Dr.R.W.Doskotch,The Ohio State University, Columbus, USA; Prof.Dr.J.R.Bull,Nat.Chem.Res.Laboratory, Pretoria, Südafrika
Cucurbitacin D:	Prof.Dr.R.W.Doskotch; Prof.Dr.D.Lavie
Cucurbitacin A und C:	Prof.Dr.J.R.Bull
Cucurbitacin L-glu.:	Dr.H.Ripperger,Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle/Saale, DDR
Cucurbitacin B-glu.:	Dr.K.Seifert,Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle/Saale, DDR

Cucurbitacin E-glu.:	Dr.H.Ripperger Prof.Dr.M.Wichtl
Cucurbitacin I-glu.:	Dr.H.Ripperger
Desacetylelaterinid:	Dr.H.Ripperger
Gratiosid:	Prof.Dr.M.Wichtl

III. Katalytische Hydrierung der Cucurbitacine B, E und I

(Herstellung der 23,24-Dihydrocucurbitacine)

10 - 40 mg Substanz wurden in 15 ml Ethanol/Ethylacetat (1:1) gelöst und mit 50 mg vorhydriertem Katalysator (Palladium/Aktivkohle (10% Pd; Merck) bzw. Palladium/Calciumcarbonat (5% Pd; Merck)) 15 min bei 2 at in einer Hydrierapparatur nach PARR hydriert. Dann wurde der Katalysator abfiltriert und das Filtrat zur Trockne eingeengt. Der Rückstand ("Hydrierungsprodukt") wurde in 4 ml Ethanol aufgenommen und chromatographisch überprüft. Die Identifizierung erfolgte a) durch Besprühen des Dünnschichtchromatogrammes mit Vanillin/Phosphorsäure (23,24-Dihydrocucurbitacine zeigen gelbe Fluoreszenz im UV 365 nm), b) durch Aufnahme der UV-Spektren (23,24-Dihydrocucurbitacin B: Endabsorption; 23,24-Dihydrocucurbitacin E: λ_{max} = 268 nm; 23,24-Dihydrocucurbitacin I: λ_{max} = 268 nm), c) bei 23,24-Dihydrocucurbitacin I durch das MS der mit HPLC gereinigten Verbindung (EI, 70eV; M^+516, 498, 480, 401, 385, 341, 164, 113).

Die Hydrierung mit Pd/C brachte die besseren Ergebnisse (Ausbeute an gereinigtem 23,24-Dihydrocucurbitacin I: 27%).

IV. Herstellung der Analysenlösungen aus cucurbitacinhaltigen Drogen

1. Allgemeiner Extraktionsgang

5 g pulverisierte Droge (im allg. Sieb-Nr.500) werden mit 50 ml Petrolether im Soxhlet ca. 2 Stdn. entfettet. Die Droge wird in der Hülse luftgetrocknet und dann 2 Stdn.

mit 50 ml Chloroform p.a. extrahiert. Nach Abkühlung und Filtration der Lösung wird sie am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt.
Bei Radix-, Semen- und Fructus-Drogen kann eine etwa 0.5%ige Lösung dieses Chloroformextraktes in Ethanol und so wenig wie nötig Chloroform als Analysenlösung zum Cucurbitacin-Screening (DC und HPLC) verwendet werden.
Bei Iberidis semen hat sich zur Abtrennung der Lipide auch eine Vorschrift von BREDENBERG und GMELIN (65) bewährt:
5 g gemahlene Samen werden im Soxhlet 3 Stdn. mit 50 ml Petrolether entfettet. Die an der Luft getrocknete Droge wird anschließend mit 50 ml Aceton ca. 2 Stdn. extrahiert. Der Acetonextrakt wird nach dem Abkühlen filtriert, zur Trockne eingeengt und dann 30 min mit 50 ml Chloroform gekocht. Die gelbe Chloroformlösung wird abfiltriert und zur Trockne eingeengt. Vom Rückstand wird wie oben eine ca. 0.5%ige Analysenlösung hergestellt.

2. Anreicherungsmethode (vor allem bei Herba-Drogen)
Der Chloroformtrockenextrakt wird in 50 ml 50%igem Methanol suspendiert und mit 30 ml Petrolether ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird anschließend dreimal mit 30 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphasen werden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und eingeengt. Aus dem Trockenrückstand wird eine ca. 0.5%ige Analysenlösung hergestellt.
Bei hohen Flavonoid- und Gerbstoffanteilen (z.B. Gratiolae herba) wurde die Anreicherungsmethode nach MÜLLER (47) angewendet:
Nach der Ausschüttelung mit Petrolether (s.o.) wird die wässrig-methanolische Lösung mit Wasser auf 200 ml ergänzt und mit 40 ml 10%iger wässriger Bleiacetatlösung versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert. Im Filtrat werden die überschüssigen Bleiionen durch 10%ige Dinatriumhydrogenphosphatlösung (ca. 10 ml) ausgefällt und die Fällung abfiltriert. Das Filtrat wird am Rotationsverdampfer auf ca. 50 ml eingeengt und dreimal mit 25 ml

Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformphasen werden über Natriumsulfat getrocknet und dann eingeengt (=E1). Anschließend wird die wässrige Phase dreimal mit 25 ml Chloroform-Isopropanol (3:2) ausgeschüttelt. Die organischen Phasen werden vereinigt und zur Trockne eingeengt (=E2). Die Extrakte E 1 und E 2 werden vereinigt und, in Ethanol/Chloroform ca. 0.5%ig gelöst, als Analysenlösung verwendet.

3. Verschiedene Extraktionsarten für Bryoniae radix

Eine frisch geerntete Wurzel (1378.7 g) von Bryonia cretica L. ssp. dioica (JACQ.)TUTIN wurde der Länge nach in vier Teile geteilt und auf verschiedene Weise extrahiert:

a) Ein Teil wurde nach einer Vorschrift von POHLMANN (72) ca. 1 min im Sorvall^{R}Omnimix mit Ethanol (1:1) extrahiert. Dann wurde abfiltriert und das Filtrat zweimal mit Chloroform (1:1) ausgeschüttelt. Die Chloroformphasen wurden vereinigt, getrocknet und zur Trockne eingeengt ("Ethanolextrakt").

b) Ein zweiter Teil wurde nach POHLMANN (72) im Sorvall^{R} Omnimix 1 min mit Wasser (1:1) extrahiert und sofort abfiltriert. Das Filtrat wurde mit der gleichen Menge Ethanol versetzt und anschließend erneut filtriert. Dieses Filtrat wurde mit Chloroform (1:1) ausgeschüttelt und die Chloroformphasen wie bei a) zur Trockne eingeengt ("Wasserextrakt").

c) Die restlichen zwei Teile wurden gefriergetrocknet bzw. luftgetrocknet (40^{o}C). Die getrockneten Drogen (Wasserverlust 73%) wurden jeweils nach der allgemeinen Vorschrift extrahiert ("Chloroformextrakte").

Aus den Extrakten wurden äquivalente Analysenlösungen hergestellt.

4. Extraktion von Cucurbitacinen aus Phytopräparaten

4.1. Urtinkturen nach dem Homöopathischen Arzneibuch (HAB)

Die Urtinkturen wurden alle ohne weitere Anreicherung der Cucurbitacine direkt untersucht.

Im Falle der Urtinktur von Bryonia wurde auch eine Untersuchungslösung gemäß HAB 1 hergestellt: 5 ml Urtinktur wurden mit 5 ml Wasser verdünnt und zweimal mit je 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 1 ml einer Mischung aus gleichen Teilen Chloroform und Ethanol aufgenommen.

Die Urtinkturen wurden aus Apotheken bezogen. Im einzelnen wurden folgende untersucht:

Bryonia Ø, Fa.DHU (Ch.B.1905)
Luffa Ø=D1, hergestellt aus Luffa D2, Schützen-Apotheke München
Colocynthis Ø=D1, Fa.DHU (Ch.B.1404)
Elaterium Ø, Fa.DHU (Ch.B.35821)
Iberis amara Ø=D1, Fa.DHU (Ch.B.37821)
Gratiola Ø, Fa.DHU (Ch.B.0101)

4.2. Colocynthis-Homaccord^{R}

Untersucht wurden die Chargen 281040 und 280180 von Colocynthis-Homaccord^{R}-Tropfen der Fa.Heel, Baden-Baden.

4.2.1. Ausschüttelung mit Chloroform

15 ml der Lösung wurden mit 10 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformphase wurde eingedampft und der Rückstand in 0.5 ml Ethanol p.a. aufgenommen. 20 µl dieser Lösung wurden für die HPLC verwendet.

4.2.2. Einengen der Lösung

20 ml Colocynthis-Homaccord^{R} wurden zur Trockne eingeengt und der Rückstand anschließend in 0.5 ml Ethanol gelöst.

4.3. Pilfor^{R}-Dragees

20 Dragees Pilfor^{R} (Fa.Sagitta-Werk,Feldkirchen; Ch.B. 801010) wurden zerstoßen und im Soxhlet zunächst mit 50 ml Hexan 1.5 Stdn. entfettet, anschließend mit 50 ml Chloroform 2 Stdn. extrahiert und der zur Trockne eingeengte Chloroformextrakt nach Suspension in 50%igem Methanol (30 ml) mit 20 ml Chloroform ausgeschüttelt.

4.4. Rheogen^{R}-Dragees

20 Dragees Rheogen^{R} (Fa.Robugen,Esslingen; Ch.B.072021) wurden wie unter 4.3. angegeben extrahiert.

5. Dünnschichtchromatographie

5.1. Adsorbentien

Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten, Schichtdicke 0.25 mm(Merck)
Kieselgel 60 F_{254}-HPTLC-Fertigplatten für die Nano-DC(Merck)

5.2. Laufmittel für Cucurbitacine

LM I	Chloroform-Methanol 4:1 (50)
LM II	Chloroform-Methanol 9:1 (50)
LM III	Diethylether-Ethylacetat 4:1 (51)
LM IV	Chloroform-Methanol-Wasser 85:14:1 (47)
LM V	Butanol-Ethylacetat-Wasser 9:10:1 (34)
LM VI	Chloroform-Ethylacetat-Ameisensäure 48:48:4 (54)
LM VII	Chloroform-Ethanol 95:5 (32)
LM VIII	Benzol-Dioxan-Ethylacetat 2:1:1 (34)
LM IX	Ethylacetat (53)
LM X	Trichlorethylen-Isopropanol 10:1 (34)
LM XI	Trichlorethylen-Isopropanol 8:1
LM XII	Trichlorethylen-Isopropanol 6:1
LM XIII	Trichlorethylen-Isopropanol 4:1 (25)
LM XIV	Ethylacetat-Cyclohexan-Methylisobutylketon 10:9:2(34)

Die Laufmittel sind täglich frisch herzustellen (1/2 Stde. Kammersättigung).

Für die gleichzeitige Auftrennung von Cucurbitacinaglykonen und -glykosiden eignen sich LM II(!), LM IV(!), LM IX und LM XIII. LM I und LM V sind hauptsächlich für Glykoside, die restlichen nur für Aglykone geeignet.

5.3. Detektion

Vanillin/Phosphorsäure-Reagenz

0.1 g Vanillin werden in 45 g Ethanol gelöst und mit 10 g 85%iger Phosphorsäure versetzt.

Die Platte wird kräftig besprüht und anschließend ca. 10 min bei 120°C im Trockenschrank erhitzt. Es wird im UV 365 nm ausgewertet. Δ 23-Cucurbitacine fluoreszieren rot, 23,24-Dihydrocucurbitacine gelb. Sterine erscheinen rötlich/orange.

Triphenyltetrazoliumchlorid-Reagenz
Eine 4%ige ethanolische Triphenyltetrazoliumchlorid(TTC)-Lösung wird kurz vor Gebrauch mit 1N-NaOH (aq.) 1:1 gemischt.
Die Platte wird bis zur Sättigung der Kieselgelschicht besprüht. Nach dem Trocknen bei 120°C erscheinen α-Ketolcucurbitacine als rote Zonen, die sich, wenn man die Platte über ausströmenden Wasserdampf hält, intensivieren.

Eisen-III-chlorid-Reagenz
5%ige Lösung von $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ in Ethanol.
Nach dem Besprühen erscheinen bei Diosphenolcucurbitacinen sofort rotbraune Zonen auf gelbem Grund. Die Platten können anschließend noch mit Vanillin/Phosphorsäure-Reagenz besprüht werden.

Fluoreszenzminderung
Cucurbitacine mit α,β-ungesättigten Ketogruppen ergeben Fluoreszenzminderung im UV 254 nm.

5.4. Auftrageweise
Von den 0.5%igen Analysenlösungen wurden 10 - 20 µl mit einer Mikroliterspritze bandförmig 0.5 - 1 cm breit aufgetragen.

6. Hochleistungsflüssigchromatographie

6.1. Technische Daten
Pumpen: M 6000A (Waters GmbH, Königstein)
Gradientenprogrammer: M 660 (Waters GmbH)
Einspritzteil: WISP 710B (Waters GmbH)
Datensystem: M 730 Datamodule (Waters GmbH)

Detektoren: LC 75 (Perkin-Elmer, Überlingen) und HP 1040A Photodiodenarray-Detektor kombiniert mit HP 85 Tischcomputer, HP 82901 Diskettenlaufwerk und HP 7470A X-Y-Plotter (Hewlett-Packard, Waldbronn)

6.2. Trennsysteme (TS)

TS 1 (allgemeines, für den Vergleich der Chloroformextrakte verwendetes System)
Säule: µ-Bondapak^{R}C18 (10µ) (300 x 4 mm ID) (Waters GmbH)
Detektion: Spektralphotometer bei 230 nm (range 0.08) bzw. kontinuierliche Aufnahme des UV-Spektrums mit HP 1040A Photodiodenarray-Detektor
Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser 20:80
B: Acetonitril-Wasser 50:50
Gradient: von 0% B nach 100% B in 45 min; linearer Anstieg
Durchfluß: 2.0 ml/min

TS 2 (Methanol-Wasser-System zur Trennung der Chloroformextrakte)
Säule: µ-Bondapak^{R}C18 (10µ) (300 x 7.9 mm ID) (Waters GmbH)
Fließmittel: A: Methanol-Wasser 50:50
B: Methanol-Wasser 80:20
Gradient: von 0% B nach 100% B in 30 min; linearer Anstieg
Detektion: 230 nm (range 0.1)
Durchfluß: 2.0 ml/min

TS 3 (Versuchssystem zur Trennung von Cucurbitacin I und L)
Säule: LiChrosorb^{R}RP18 (10µ) (300 x 4 mm ID) (von uns selbst gepackt)
Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser 20:80
B: Acetonitril-Wasser 50:50
Gradient: von 0% B in 10 min auf 25% B, dann in 15 min auf 33.3% B, schließlich in 20 min auf 100% B; jeweils linearer Anstieg
Durchfluß: 2.0 ml/min
Detektion: 230 nm (range 0.04)

TS 4 (Versuchssystem zur Trennung von Cucurbitacin I und L)
Säule: LiChrosorb^{R}RP18 (10µ) (300 x 4 mm ID)
Fließmittel: Acetonitril-Wasser 27.5:72.5 (isokratisch)
Durchfluß: 2.0 ml/min
Detektion: 230 nm (range 0.04)

TS 5 (Trennsystem für die Chloroformextrakte)
Säule: µ-Bondapak^{R}C18 (10µ) (300 x 4 mm ID) (Waters GmbH)
Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser 25:75
B: Acetonitril-Wasser 45:55
Gradient: von 0% B nach 100% B in 30 min; linearer Anstieg
Durchfluß: 2.0 ml/min
Detektion: 230 nm (range 0.04)

TS 6 (Trennsystem für die Chloroformextrakte)
Säule: LiChrosorb^{R}RP18 (5µ) (125 x 4 mm ID) (Merck)
Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser 25:75
B: Acetonitril-Wasser 45:55
Gradient: von 0% B nach 100% B in 30 min; linearer Anstieg
Durchfluß: 1.0 ml/min
Detektion: 230 nm (range 0.04)

TS 7 (für die Gehaltsbestimmung der Cucurbitacine von Luffa operculata)
Säule: LiChrosorb^{R}RP18 (5µ) (125 x 4 mm ID) (Merck)
Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser 30:70
B: Acetonitril-Wasser 45:55
Gradient: von 0% B nach 100% B in 20 min; linearer Anstieg
Durchfluß: 1.0 ml/min
Detektion: 230 nm (range 0.08)

TS 8 (für die Bestimmung der Diosphenolcucurbitacine von Bryoniae radix)
Säule: µ-Bondapak^{R}C18 (10µ) (300 x 4 mm ID) (Waters GmbH)
Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser-Essigsäure 25:75:1
B: Acetonitril-Wasser-Essigsäure 45:55:1
Gradient: von 0% B nach 100% B in 30 min; linearer Anstieg
Durchfluß: 2.0 ml/min
Detektion: 270 nm (range 0.08)

TS 9 (für die Isolierung der Cucurbitacinglykoside aus Colocynthidis fructus im semipräparativen Maßstab)
Säule: μ-Bondapak^{R}C18 (10μ) (300 x 7.9 mm ID) (Waters GmbH)
Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser 25:75
B: Acetonitril-Wasser 45:55
Gradient: von 0% B nach 100% B in 20 min; linearer Anstieg
Durchfluß: 3.0 ml/min
Detektion: 254 nm (range 0.1)

6.3. Lösungsmittel

Das verwendete Acetonitril und Methanol besaß ChromAr-Qualität der Fa.Promochem, Wesel. Das Wasser war für die analytische HPLC demineralisiert, für die präparative HPLC zusätzlich destilliert.

6.4. Zubereitung der Probenlösungen

Die Extrakte wurden in Ethanol und, falls nötig, in wenig Chloroform ca. 0.5%ig gelöst und mittels Filtration durch ein Teflonfilter (Porendurchmesser 0.45 μ; Fa.Sartorius) von Schwebstoffen befreit. Von den Reinsubstanzen wurden entsprechend ca. 0.01%ige Lösungen hergestellt. Für eine analytische HPLC-Trennung wurden davon jeweils 5 - 10 μl eingespritzt.

7. Isolierung der Cucurbitacinglykoside aus Colocynthidis fructus mit HPLC

7.1. Anreicherung der Cucurbitacine

110.0 g Colocynthidis fructus pulv. (Galke) wurden nach der allgemeinen Vorschrift zunächst mit 500 ml n-Hexan entfettet und anschließend mit 500 ml Chloroform erschöpfend extrahiert. Der zur Trockne eingeengte Chloroformextrakt (4.1 g) wurde in 100 ml Chloroform gelöst und dreimal mit 100 ml Wasser ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit 100 ml Chloroform zurückgeschüttelt, die Chloroformphasen vereinigt, mit Natriumsulfat getrocknet und eingeengt (Fraktion I: 2.65 g). Die wässrige

Phase wurde nach einer Vorschrift von MÜLLER (47) mit 15 g $Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$ versetzt und dreimal mit 100 ml Chloroform-Isopropanol (3:2) ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und zur Trockne eingeengt (Fraktion II: 0.95 g).
Zur weiteren Reinigung wurden die Fraktionen in jeweils ca. 40 ml Chloroform gelöst und durch Zugabe von n-Hexan umgefällt. Auf diese Weise konnte aus Fraktion I Cucurbitacin E-glucosid gewonnen werden (1.68 g; ca. 90% rein).

7.2. Semipräparative Isolierung mit HPLC

Fraktion II wurde durch semipräparative HPLC (Trennsystem TS 9) weiter aufgetrennt. Aus 20 mg Fraktion II wurden in Durchgängen von jeweils 2 mg insgesamt 7.1 mg Cucurbitacin I- und L-glucosid (Peak 2), 2.4 mg Cucurbitacin E-glucosid (Peak 3) und 1.7 mg einer unbekannten Verbindung (Peak 1) erhalten. Die einzelnen Peaks wurden von Hand gemäß dem Detektorsignal fraktioniert, die aufgefangenen Eluate am Rotationsverdampfer soweit eingeengt, bis eine wässrige Lösung verblieb, und diese dann gefriergetrocknet. Die Verbindungen wurden chromatographisch auf Reinheit und Identität geprüft.

8. Quantitative Bestimmung der Cucurbitacine in Luffae fructus durch HPLC

8.1. Herstellung der Analysenlösungen

Die Extrakte wurden aus jeweils einem "Luffaschwämmchen" nach der allgemeinen Extraktionsvorschrift hergestellt: Die von den Samen befreiten Schwämmchen wurden zerschnitten, zunächst 1 Stde. im Soxhlet mit 50 ml n-Hexan entfettet, und dann die wieder getrocknete Droge 2 Stdn. mit 50 ml Chloroform extrahiert. Die Chloroformlösung wurde einrotiert und in einen 100 ml Meßkolben überführt. Nach Zugabe von 5.00 ml einer 0.1%igen Stammlösung von p-Hydroxybenzoesäureethylester (Innerer Standard) in Methanol wurde mit Methanol auf 100.00 ml aufgefüllt.

8.2. Herstellung der Eichlösung

1.67 mg Cucurbitacin B, 1.98 mg Cucurbitacin D, 0.82 mg Cucurbitacin B-glucosid und 1.00 mg p-Hydroxybenzoesäureethylester (1.00 ml der 0.1%igen Stammlösung) wurden in einem Meßkölbchen gelöst und mit Methanol auf 5.00 ml aufgefüllt.

8.3. Kalibrierung

Die Kalibrierung erfolgte elektronisch durch das M730 Datamodule nach einem Kalibrierungslauf mit 5 µl der Eichlösung und anschließender Eingabe der eingewogenen Substanzmengen, mit folgender Formel:

$$RF_i = \frac{\text{Menge}_i}{\text{Fläche}_i} \times 1000$$

Zur Überprüfung wurde der Eichlauf dreimal wiederholt. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 5, S. 58,

Um die Linearität dieser Beziehung über einen größeren Bereich zu testen, wurden verschiedene Mengen der Eichlösung eingespritzt und die Peakfläche in Abhängigkeit von der eingespritzten Substanzmenge ausgewertet (vgl. Tab. 16 a) - d), S. 169 und Abb. 27, S. 58).

Da wir anhand der UV-Spektren und der Retentionszeiten feststellen konnten, daß es sich bei den Peaks Nr. 1 und 5 (vgl. Abb. 28, S. 60) vermutlich um α-Ketolcucurbitacinglykoside und bei Peak 7 um ein α-Ketolcucurbitacin-Aglykon handelt, verwendeten wir für diese Peaks bei der quantitativen Auswertung die Korrekturfaktoren von Cucurbitacin B-glucosid bzw. Cucurbitacin B.

Tabelle 16: Peakfläche in Abhängigkeit von der Substanzmenge

a) Cucurbitacin B							
Menge (µg)	0.67	1.67	3.34	6.68	13.36	20.04	26.72
Flächeneinheiten x 10^5	6.6	13.9	26.7	52.8	104.9	154.8	202.3
b) Cucurbitacin D							
Menge (µg)	0.79	1.98	3.96	7.92	15.84	23.76	31.68
Flächeneinheiten x 10^5	7.8	16.6	31.8	63.0	125.9	165.0	179.0
c) Cucurbitacin B-glucosid							
Menge (µg)	0.33	0.82	1.64	3.28	6.56	9.84	13.12
Flächeneinheiten x 10^5	1.9	4.1	7.7	15.2	28.4	34.2	36.8
d) p-Hydroxybenzoesäureethylester							
Menge (µg)	0.4	1.0	2.0	4.0	8.0	12.0	16.0
Flächeneinheiten x 10^5	5.5	11.7	22.3	43.9	87.7	165.9	267.9

8.4. Quantitative Bestimmung

Von den Analysenlösungen wurden 10 µl eingespritzt und die Chromatogramme elektronisch mit dem M730 Data module nach der Methode des Inneren Standards (IS) ausgewertet. Der Berechnung lag folgende Formel zugrunde:

$$\text{Menge}_i = \frac{\text{Fläche}_i \times RF_i}{\text{Fläche}_{IS} \times RF_{IS}} \times \text{Menge}_{IS}$$

Man erhält auf diese Weise die Absolutmengen der Cucurbitacine. Unter Berücksichtigung der Drogeneinwaage (Trockengewicht) wurden der prozentuale Gehalt der einzelnen Cucurbitacine und der Gesamtgehalt an Cucurbitacinen als Summe aller Einzelgehalte ausgerechnet (vgl. Tab. 17, S. 170).

Tabelle 17: Ergebnisse der quantitativen Bestimmung der Cucurbitacine in Luffae fructus (Gehalt in mg)

Droge	Einwaage mg	Peak 1	Cu. D	Cu.B-glu.	Peak 5	Cu. B	Peak 7
Luffa 1	800	1.9	1.0	12.1	0.5	15.3	0.8
Luffa 2	1200	1.5	1.7	11.1	0.3	21.9	1.3
Luffa 3	520	1.8	0.8	11.4	0.4	9.1	0.4

Luffa 1 = Luffae fructus, MÜGGENBURG, Ch.B.100402
Luffa 2 = Luffa purgans, ALSITAN, Ch.B.128213
Luffa 3 = Luffa purgans, ALSITAN, Ch.B.028215

9. Vergleich verschiedener Bryoniae radix Chargen

9.1. Herstellung der Analysenlösungen

Die getrockneten und pulverisierten Muster von Bryoniae radix (vgl. Tab. 15, S. 156) wurden alle unter einheitlichen Bedingungen extrahiert:
Ca. 10 g gepulverte Droge wurden zunächst 2 Stdn. mit 50 ml n-Hexan im Soxhlet entfettet. Die wieder getrocknete Droge wurde anschließend 2 Stdn. mit 50 ml Chloroform extrahiert; der Chloroformextrakt zur Trockne eingeengt, in etwas Chloroform und Ethanol gelöst und in einen Meßkolben überführt. Mit Ethanol und nötigenfalls Chloroform wurde nach Zugabe von 1.00 ml einer 0.1%igen Stammlösung von p-Hydroxybenzoesäureethylester (= IS) auf 10.00 ml aufgefüllt.

9.2. Herstellung der Eichlösung

1.09 mg Cucurbitacin E, 1.25 mg Cucurbitacin I, 1.19 mg Cucurbitacin R, 0.99 mg 23,24-Dihydrocucurbitacin B, 1.70 mg Elaterinid und 1.03 mg Acetylbryoamarid wurden zusammen mit 1.0 ml einer 0.02%igen Stammlösung von p-Hydroxybenzoesäureethylester in einem Meßkölbchen ad 2.00 ml gelöst.

9.3. Kalibrierung

Entsprechend den Angaben bei der Gehaltsbestimmung von Luffae fructus wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Über die Molekulargewichte wurde der Eichfaktor für Bryoamarid aus dem von Acetylbryoamarid abgeleitet:

$$RF_{Bryoamarid} = RF_{Acetylbryoamarid} \times \frac{678}{720}$$

9.4. Quantitative Bestimmung

Von den Analysenlösungen wurden jeweils 10 µl eingespritzt. Die Bestimmung der Diosphenolcucurbitacine erfolgte im Trennsystem TS 8 bei 270 nm. Die bei dieser Wellenlänge nicht detektierbaren α-Ketolcucurbitacine wurden ohne Säurezusatz im System TS 5 bei 230 nm bestimmt.
Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte elektronisch mit dem M730 Data module über die Methode des Inneren Standards. Die Berechnung von Peak 1 (Cucurbitacin I- und L-glucosid erfolgte unter Bezug auf Bryoamarid (= Cucurbitacin L-glucosid), von Peak 5 (Cucurbitacin I und L) auf Cucurbitacin I. Die erhaltenen Absolutmengen wurden mit der jeweiligen Einwaage in Prozentwerte umgerechnet (Ergebnisse siehe Tabelle 8, S. 67).

Kapitel 2:

I. Herkunft der Droge

1 kg Radix Tayuyae erhielten wir am 10.5.1978 von der Fa. F.G.CELO, Zweibrücken, in der Form von 3 - 5 cm langen, schmalen Stücken. Hieraus wurden die Flavonoide isoliert.
Weitere 4.6 kg dieser Droge (2.2 kg in Stücken; 2.4 kg pulvis) erhielten wir am 29.4.1982 von der Fa.F.G.CELO. Aus dieser Charge wurden die Cucurbitacine isoliert.
Beide Chargen waren chromatographisch identisch.

II. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Die REM-Aufnahmen wurden bei der Daimler-Benz AG, Mannheim, mit einem JSM-35C Rasterelektronenmikroskop (Jeol) aufgenommen.

III. Allgemeine Arbeitsmethoden

1. Dünnschichtchromatographie

Die DC erfolgte mit den bereits für das Kapitel 1 (siehe S.162f) beschriebenen Methoden.
Zusätzlich wurden folgende Laufmittel verwendet:

LM XV Chloroform-Methanol-Wasser 64:50:10 (für Zucker)
LM XVI Diethylether (101) (für die Trennung der Cucurbitacinisomeren)
LM XVII Ethylacetat-Ameisensäure-Eisessig-Wasser (118) (für die Flavonoide)

Bei der Detektion verwendeten wir außerdem nachstehend aufgeführte Reagenzien:

Diphenylamin-Reagenz (für Zucker)
2 ml Anilin und 2 g Diphenylamin werden in 90 ml Methanol und 10 ml 85%iger Phosphorsäure gelöst.
Die Zucker erscheinen nach dem Erhitzen der besprühten Platte (100°C; 10 min) im vis als braune bis blaue Zonen.

Naturstoff(NST)/PEG-Reagenz (für Flavonoide) (118)
Eine 1%ige methanolische Lösung von Diphenylboryloxyethylamin und eine 5%ige ethanolische Polyethylenglykol-4000-Lösung (PEG) werden nacheinander auf die Platte gesprüht.

Mit Flavonoiden entstehen innerhalb 15 min im UV 365 nm intensive Fluoreszenzfarben.

2. Hochleistungsflüssigchromatographie

2.1. Technische Daten

Für analytische Arbeiten wurde die bereits für Kapitel 1 beschriebene Anlage benutzt (siehe S. 163f).
Außerdem stand folgende Geräteanordnung zur Verfügung, die wir vor allem bei den präparativen Arbeiten benutzten:
Pumpen: Serie 3B (Perkin-Elmer, Überlingen)
Detektor: Schoeffel SF 770 Spektralphotometer
Schreiber: Recorder 56 (Perkin-Elmer)

2.2. Trennsysteme

2.2.1. Analytische HPLC

Für die Trennung der Cucurbitacine aus Tayuyae radix wurden die Trennsysteme TS 1 und TS 5 aus Kapitel 1 verwendet (siehe S. 164f).
Zur Trennung der Flavonglykoside benutzten wir TS 5 (siehe S. 165) sowie folgendes System:
TS 10 (für Flavonglykoside) (modifiziert nach (120))
Säule: LiChrosorb^{R}RP18 (5µ) (125 x 4 mm ID) (Merck)
Fließmittel: Acetonitril-Wasser-Essigsäure 18:82:1
Durchfluß: 1.0 ml/min
Detektion: 340 nm (range 0.04)

2.2.2. Präparative HPLC

Für die Isolierung der Cucurbitacine aus dem Chloroformextrakt wurden die folgenden präparativen und semipräparativen HPLC-Systeme (PTS) verwendet:

PTS 1 (zur Vorfraktionierung des Chloroformextraktes)
Säule: 55 x 2.5 cm ID Stahlsäule, gefüllt mit PrepPak^{R}C18-Material (60µ) (Waters GmbH)
Fließmittel: A: Methanol-Wasser 50:50
B: Methanol-Wasser 80:20
Gradient: von 0% B in 25 min auf 30% B, dann in 25 min auf 35% B und in 20 min auf 100% B; jeweils linearer Anstieg
Durchfluß: 20.0 ml/min
Detektion: 230 nm (range 0.1)

PTS 2 (zur Auftrennung von Fraktion I und II)
Säule: µ-Bondapak^{R}C18 (10µ) (300 x 7.9 mm ID) (Waters GmbH)
Fließmittel: Methanol-Wasser 57.5:42.5
Durchfluß: 2.0 ml/min
Detektion: 230 nm (range 0.1)

PTS 3 (zur Auftrennung von Fraktion III)
Säule: wie bei PTS 2
Fließmittel: Acetonitril-Wasser 45:55
Durchfluß: 2.0 ml/min
Detektion: 200 nm (range 0.1)

PTS 4 (zur Reinigung von C.t. IV)
Säule: wie bei PTS 2
Fließmittel: Acetonitril-Wasser 40:60
Durchfluß: linearer Gradient von 1.0 ml/min in 20 min auf 1.5 ml/min
Detektion: 200 nm (range 0.1)

PTS 5 (zur Reinigung von C.t. VI)
Säule: wie bei PTS 2
Fließmittel: Acetonitril-Wasser 35:65
Durchfluß: 2.0 ml/min
Detektion: 200 nm (range 0.1)

3. Offene Säulenchromatographie

Für die präparative Trennung der Flavonglykoside wurde eine Polyamidsäule eingesetzt: Das gewaschene Polyamidpulver wurde mit 20%igem Methanol suspendiert und in die Säule (5 cm ID; 36 cm Füllhöhe) eingebracht. Dann wurde mit ca. 1000 ml 20%igem Methanol nachgewaschen bis das Eluat klar war. Das zu trennende Substanzgemisch wurde mit etwas Polyamid angerieben und auf die Säule gegeben.

Mit einer Tropfgeschwindigkeit von 24 - 26 Tropfen/min wurde mit Methanol/Wassermischungen eluiert.

(Herstellung von Polyamid siehe Literatur (197).)

IV. Physikalisch-chemische Untersuchungen

1. Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden auf einer Kofler-Heizbank der Fa.Reichert, Wien, bestimmt; sie sind unkorrigiert.

2. UV-Spektren

Die UV-Spektren der Flavonoide wurden mit einem UV-Spektrometer DB-G (Fa.Beckman,München) aufgenommen.

Die UV-Spektren der Cucurbitacine konnten mit Hilfe des HP 1040A Photodiodenarray-Detektors (Fa.Hewlett-Packard, Waldbronn) in Kombination mit einem HP 85 Tischcomputer, einem HP 82901 Diskettenlaufwerk und einem HP 7470A X-Y-Plotter (Fa.Hewlett-Packard, Waldbronn) während der HPLC-Trennungen aufgenommen werden.

3. IR-Spektren

Die Substanzen wurden in Kaliumbromid gepreßt mit einem AccuLab 1 Spektrophotometer (Fa.Beckman, München) gemessen.

4. Massenspektren

4.1. EI-MS

Die EI-Massenspektren wurden an unserem Institut mit dem Massenspektrometer MS 30 der Fa. AEI, Manchester, aufgenommen (4 kV; 70eV).

4.2. DCI-MS

Die DCI-Spektren wurden am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg mit einem Massenspektrometer MAT 44S, gekoppelt an ein Datensystem MAT SS 200 (Fa. Finnigan) mit Ammoniak als Reaktantgas (Reaktantgasdruck: 350 µbar) bei einer Quellentemperatur von 130° und einer Ionisierungsenergie von 170 eV aufgenommen.

Die Proben wurden mit einer heizbaren Schubstange in die Ionenquelle eingeführt und mit einem Temperaturprogramm von 30° auf 300° (30°/min) verdampft.

Ein DCI-Spektrum mit Isobutan als Reaktantgas wurde mit derselben Technik (MAT 44S) an unserem Institut von Herrn Priv.Dozent Dr.Stöckigt (Lehrstuhl Prof.Dr.Zenk) aufgenommen.

4.3. FAB-MS

Die FAB-Spektren wurden bei der Fa. VG Instruments, Wiesbaden, mit einem FAB 70E MS-System aufgenommen. Die Proben wurden in Glycerin suspendiert und mit einer Schubstange in die Ionenquelle eingeführt.

5. ^{1}H-NMR-Spektren

Die Aufnahme der Protonen-Kernresonanzspektren erfolgte an unserem Institut mit einem Varian A-60 Kernresonanzspektrophotometer.

6. ^{13}C-NMR-Spektren

Die ^{13}C-NMR-Spektren wurden am Institut für Anorganische Chemie der Universität München mit einem Bruker WP-200 Kernresonanzspektrophotometer bei 50.3 MHz aufgenommen.

V. Pharmakologische Untersuchungen

1. Screening auf Antitumorwirksamkeit am National Cancer Institut, Bethesda, Maryland, USA

Wir ließen je eine nach einer Vorschrift des NCI hergestellte Ethanol- und Chloroformfraktion+) unter den NCI-Codenummern B 838798 und B 838799 auf Zytotoxizität testen. Die in vitro-Untersuchungen erfolgten in Zellkulturen des KB-Systems (kultivierte Tumorzellen aus einem humanen Nasopharynx-Epidermiscarcinom), die in vivo-Teste an Mäusen mit Lymphozytenleukämie (P 388-System).

2. Bestimmung des Phagozytose-Index

Die Bestimmung des Phagozytose-Index an Granulozyten wurde an unserem Institut in einem modifizierten Test nach BRANDT (126) durchgeführt. Der genaue Ablauf des Testes wird von KREUTZKAMP (198) beschrieben.

VI. Spezielle Arbeitsmethoden

1. Isolierung der Cucurbitacine mittels HPLC

1.1. Extraktion

164.8 g gemahlene Wurzel wurden 4 Stdn. mit 600 ml n-Hexan entfettet, und der luftgetrocknete Drogenrückstand dann mit 600 ml Chloroform am Soxhlet 4 Stdn. extrahiert. Der Chloroformextrakt wurde zur Trockne eingeengt (gelbes, aufgeblähtes Harz; 3.86 g). Anschließend wurde die Droge noch mit Ethanol extrahiert (Ausbeute: 30.0 g).

1.2. Vorfraktionierung des Chloroformextraktes mit präparativer HPLC

1.0 g Chloroformextrakt wurden in 4 ml Ethanol mit wenig Chloroform gelöst und mittels präparativer HPLC in vier Durchgängen zu je 1 ml fraktioniert.

+) 300 g pulverisierte Droge wurden mit Petrolether entfettet. Der Ethanolextrakt wurde durch Soxhletextraktion des getrockneten Materials mit 96%igem Ethanol gewonnen. 2/3 des Extraktes wurden gegen Chloroform-Wasser (1:1) verteilt. Die Chloroformphase bildet den Chloroformextrakt.

Es wurde das Trennsystem PTS 1 verwendet. Entsprechend dem Detektorsignal wurde in vier Fraktionen geschnitten (vgl. Abb. 44, S. 95). Die Eluate wurden am Rotationsverdampfer soweit eingeengt, bis nur noch eine wässrige Lösung verblieb, die wir anschließend gefriertrockneten. Ausgehend von 1.0 g Chloroformextrakt erhielten wir folgende Ausbeuten:

Fraktion 1: 40 mg (gelbes Pulver)
Fraktion 2: 200 mg (weißes Pulver)
Fraktion 3: 285 mg (weißes Pulver)
Fraktion 4: 55 mg (weißlich braunes Pulver)

1.3. Semipräparative Auftrennung der Fraktionen

Fraktion 1 wurde in dem semipräparativen Trennsystem PTS 2 in die Substanzen C.t. I bis C.t. IV aufgetrennt, Fraktion 2 in demselben System in die Peaks C.t. IV, C.t. V und C.t. VI. Für die weitere Reinigung von Fraktion 3 wurde das PTS 3 eingesetzt, wobei die Verbindungen C.t. VII bis C.t. XII isoliert werden konnten.

Die Fraktionen wurden jeweils in möglichst kleinen Volumina gelöst und, falls sie wegen der geringen Menge nicht filtriert werden konnten, durch Zentrifugieren von Schwebstoffen befreit. Von den Lösungen wurden ca. 100 µl (2 - 10 mg Substanz) in wiederholter Weise eingespritzt und gemäß dem Detektorsignal fraktioniert. Die Eluate wurden wie oben beschrieben gefriergetrocknet.

Bei dieser Art der Isolierung ist besonderer Wert auf rückstandsfreie Lösungsmittel zu legen. Aus diesem Grund verwendeten wir statt demineralisiertem Wasser ausschließlich destilliertes Wasser.

Die Ergebnisse dieser ersten Auftrennung der Fraktionen sind in Tab. 9, S. 90, wiedergegeben. Die weitere Reinigung der einzelnen Verbindungen erfolgte mit denselben semipräparativen Trennsystemen. Wir erhielten so insgesamt folgende Ausbeuten:

Aglykon 1:	22.5 mg	(98.4% rein)
Aglykon 2:	23.0 mg	(96.5% rein)
Glykosid 1:	6.3 mg	(95.3% rein)
Glykosid 2:	10.8 mg	(96.0% rein)
C.t. XII:	2.0 mg	(95.0% rein)

Der Reinheitsgrad wurde mittels analytischer HPLC nach der 100%-Methode ermittelt.

2. Isolierung der Flavonoide

2.1. Extraktion

1000 g gemahlene Wurzel wurden im Soxhlet mit Petrolether entfettet und das getrocknete Drogengut anschließend mit 4000 ml Chloroform erschöpfend extrahiert. Der Chloroformextrakt wurde eingeengt und für die Untersuchung der Cucurbitacine verwendet. Die Droge wurde dann mit 6000 ml Ethanol ausgezogen. Beim Einengen der Lösung fiel ein gelblichweißer Niederschlag aus, der abfiltriert und getrocknet wurde (37.2 g). Eine vierte Extraktion wurde mit 70%igem Methanol als Perkolation durchgeführt. Das Eluat wurde mit dem Filtrat des Ethanolextraktes vereinigt und zur Trockne eingeengt (158.4 g).

2.2. Fraktionierte Kristallisation von Swertisin und Spinosin

Aus einer Lösung des Niederschlages der Ethanolextraktion in 50%igem Methanol fiel zunächst Swertisin aus, und im Filtrat nach längerem Stehen Spinosin. Beide Substanzen wurden aus 50%igem Methanol noch einmal umkristallisiert.

2.3. Säulenchromatographische Isolierung der übrigen Flavonoide

3.0 g der nach Vorschrift 2.1. vereinigten alkoholischen Extrakte (EtOH u.MeOH) wurden auf eine Polyamidsäule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit verschiedenen Methanol/Wasser-Gemischen. Nachdem die erste Zone den Auslauf der Säule erreicht hatte, wurde in Schritten von ca. 25 ml fraktioniert.

Der Vorlauf enthielt nahezu reines Spinosin, das aus 50%igem Methanol umkristallisiert wurde (538.8 mg). Die Frak-

tionen 1 - 80 (20% Methanol) wurden vereinigt. Beim Einengen fiel ein feinkörniger Niederschlag aus, der abfiltriert und umkristallisiert wurde (Vicenin 2, 24.3 mg). Aus den vereinigten Fraktionen 81 - 125 (30%iges Methanol) fiel beim Einengen ein chromatographisch nahezu reiner Niederschlag aus. Nach erneutem Umkristallisieren aus 50%igem Methanol erhielten wir daraus Swertisin (56.6 mg). Beim Einengen der Fraktionen 126 - 275 (35% Methanol) verblieb ein bräunlicher Rückstand (65.4 mg), der säulenchromatographisch in Swertisin und Isovitexin getrennt werden konnte.

Aus den Fraktionen 276 - 385 (40-50% Methanol; 985.4 mg) konnten wir durch erneute Säulenchromatographie Vitexin isolieren.

3. Hydrolysen

3.1. Schwefelsäure-Hydrolyse

Nach einer Vorschrift von YAMADA und Mitarb. (109) wurden 20 mg Chloroformextrakt mit 20 ml 0.5 N-H_2SO_4 (in 50%igem Ethanol) 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Dann wurde die Lösung in 100 ml Wasser gegossen und mit 150 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphase wurde einrotiert und für die Analyse verwendet.

3.2. Trifluoressigsäure-Hydrolyse

5 mg Chloroformextrakt wurden mit 1 ml 2N-Trifluoressigsäure 5 Stdn. am Dampfbad erhitzt. Anschließend wurde die Trifluoressigsäure durch mehrmaliges Abrotieren unter wiederholter Zugabe von Methanol vertrieben. Der Rückstand wurde in Methanol gelöst und chromatographisch im Hinblick auf Aglykone und Zucker untersucht. Entsprechend wurde beim Zuckernachweis in den isolierten Verbindungen verfahren, wobei aber jeweils nur ca. 1 mg Substanz eingesetzt wurde.

3.3. Enzymatische Hydrolysen

Jeweils 40 mg Chloroformtrockenextrakt wurden in parallelen Ansätzen mit 50 Einheiten α-Glucosidase (Fa. SIGMA) bzw. β-Glucosidase (Fa.SIGMA) in 6 ml Ammoniumsulfatlösung (pH 6) bzw. 6 ml Acetatpuffer (pH 4.9) 24 Stdn. bei 37°C inkubiert. Die Lösungen wurden anschließend mit Chloroform ausgeschüttelt und die Chloroformphasen chromatographiert. In beiden Fällen war das Chromatogramm des Chloroformextraktes unverändert. Als störend erwies sich, daß der Chloroformextrakt in den wässrigen Medien nur schlecht löslich ist.

Ein ähnlicher Ansatz mit 50 mg Cellulase (Fa.SIGMA) in 10 ml Wasser bei 36°C führte dagegen innerhalb 24 Stdn. zu einer vollständigen Hydrolyse.

Entsprechende Ansätze wurden auch mit den isolierten Glykosiden durchgeführt, wobei von 0.2 mg Substanz und ca. 4 mg Enzym ausgegangen wurde.

VII. Identifizierung der isolierten Verbindungen

1. Swertisin (Flavonoid 3; C.t. I)

$C_{22}H_{22}O_{10}$

Smp.: 240°C (Lit.(116): 243°C)

DC: R_f 0.53 (LM XVII)

$$\frac{R_f \text{ Vitexin}}{R_f \text{ Swertisin}} = 1.28 \text{ (LM XVII)}$$

HPLC: Rt. 8.1 min (TS 10)

$$\frac{\text{Rt. Vitexin}}{\text{Rt. Swertisin}} = 0.75 \text{ (TS 10)}$$

UV: (MeOH) λmax = 213, 270, 332 nm
(+NaOAc) 270, 390 nm
(+H_3BO_3) 270, 340 nm
(+$AlCl_3$) 217(sh), 233(sh), 278, 303, 354, 380(sh) nm
(+HCl) 232(sh), 278, 302, 350, 382(sh) nm

IR: (KBr) ν = 3380 (OH), 1640 (C=O), 1590 (C=C), 1470, 1435, 1340, 1192, 1095 (C-O), 830 cm^{-1}

MS: (der permethylierten (199) Verbindung; EI 70 eV, 4 kV)
m/z (rel.Int.): 530 (M^+, 11%), 515(14), 499(48), 483(9), 452(10), 427(10), 407(8), 397(7), 369(13), 367(18), 355(100), 341(53), 325(22), 323(21), 311(26), 297(16), 101(67), 99(35), 98(96), 75(45), 73(41), 71(78), 45(95)

NMR: (DMSO-d_6; TMS int.)
δ (ppm): 8.03 (d, J=9Hz, 2H, H-2',6'); 6.98 (d, J=9Hz, 2H, H-3',5'), 6.86 (s, 2H, H-3,8), 4.69 (d, J=10Hz, H-1"), 3.91 (s, $-OCH_3$), 3.0-3.8 (m, 9H, Glu-H), 1047 (s, 1H, HO-4'), 13.62 (s, 1H, HO-5)

2. Spinosin (Flavonoid 4)

$C_{28}H_{32}O_{15}$

Smp.: 253-255°C (Lit.(123): 255-256°C)

DC: R_f 0.30 (LM XVII)

$$\frac{R_f \text{ Vitexin}}{R_f \text{ Spinosin}} = 2.27 \text{ (LM XVII)}$$

HPLC: Rt. 6.1 min (TS 10)

$$\frac{\text{Rt. Vitexin}}{\text{Rt. Spinosin}} = 1.0 \text{ (TS 10)}$$

UV: (MeOH) λmax = 214, 272, 334 nm
(+NaOAc) 270, 300(sh), 394 nm
(+H_3BO_3) 271, 340 nm
(+$AlCl_3$) 232(sh), 263(sh), 280, 303, 355, 390(sh) nm
(+HCl) 218(sh), 233(sh), 263(sh), 280, 303, 352, 390(sh) nm

IR: (KBr) ν = 3300 (OH), 1640 (C=O), 1590 (C=C), 1340, 1190, 1010 (C-O), 833 cm^{-1}

MS: (der permethylierten Verbindung; EI 70 eV)
m/z (rel.Int.): 743 (M^+; 1.8%), 687(1.5), 559(4), 545(5), 515(29), 499(100), 467(10), 367(12), 341(61), 327(23), 325(23), 311(18), 203(4), 193(5), 187(4), 155(6), 143(37), 142(55), 101(75), 88(69), 71(46), 45(116)

3. Vicenin 2 (Flavonoid 5)

$C_{27}H_{30}O_{15}$

Smp.: 230-232°C (Lit.(116): 233-236°C)
DC: R_f 0.21 (LM XVII)

$$\frac{R_f \text{ Vitexin}}{R_f \text{ Vicenin 2}} = 3.24 \text{ (LM XVII)}$$

HPLC: Rt. 2.6 min (TS 10)

$$\frac{\text{Rt. Vitexin}}{\text{Rt. Vicenin 2}} = 2.35 \text{ (TS 10)}$$

UV: (MeOH) λmax = 215, 272, 331 nm
(+NaOMe) 282, 334, 400 nm
(+NaOAc) 282, 335, 397 nm
(+H_3BO_3) 285, 320, 350, 406 nm
(+$AlCl_3$) 219, 233(sh), 279, 305, 353, 385(sh)
(+HCl) 219(sh), 232(sh), 277, 303(sh), 346, 385(sh)

IR: (KBr) ν = 3380 (OH), 1620 (C=O), 1570 (C=C), 1350, 1210, 1070 (C-O), 820 cm^{-1}

MS: (der permethylierten Verbindung; EI 70 eV)
m/z (rel.Int.): 748 (M^+; 12%), 733(30), 717(100), 703(22), 701(13), 645(18), 585(43), 573(69), 559(26), 541(17), 527(26), 425(10), 397(18), 383(22), 135(60), 131(48), 101(190), 88(196), 71(147)

4. Vitexin (Flavonoid 1)

$C_{21}H_{20}O_{10}$

Smp.: 262-264°C (Lit.(116): 264-265°C)
DC: R_f 0.68 (LM XVII)

HPLC: Rt. 6.1 min (TS 10)

UV: (MeOH) λmax = 269, 299(sh), 331 nm
(+NaOAc) 278, 312, 389 nm
(+H_3BO_3) 270, 340 nm
(+$AlCl_3$) 218(sh), 232(sh), 277, 304, 349, 384 nm
(+HCl) 217(sh), 230(sh), 276, 303, 344, 382 nm

IR: (KBr) ν = 3250 (OH), 1650 (C=O), 1610, 1560 (C=C), 1500, 1350, 1285, 1160, 810 cm^{-1}

MS: (der permethylierten Verbindung; EI, 70 eV)
m/z (rel.Int.): 530 (M^+; 54%), 369(14), 355(100), 341(32), 325(15), 311(10), 223(4), 209(5), 193(7), 135(8), 131(13), 127(7), 101(54), 89(10), 88(81), 75(13), 71(43), 45(42)

5. Isovitexin (Flavonoid 2)

$C_{21}H_{20}O_{10}$

Smp.: 245-246°C (Lit.(116): 246-247°C)
DC: R_f 0.55 (LM XVII)

$$\frac{R_f \text{ Vitexin}}{R_f \text{ Isovitexin}} = 1.24 \text{ (LM XVII)}$$

HPLC: Rt. 7.1 min (TS 10)

$$\frac{\text{Rt. Vitexin}}{\text{Rt. Isovitexin}} = 0.86 \text{ (TS 10)}$$

UV: (MeOH) λmax = 214, 271, 335 nm
(+MeONa) 277, 326, 399 nm
(+AcONa) 278, 333, 395 nm
(+H_3BO_3) 271, 342 nm

($+AlCl_3$) 217(sh), 230(sh), 260(sh), 278, 304, 352, 382(sh) nm

(+HCl) 217(sh), 230(sh), 279, 302, 345, 382(sh) nm

MS: (der permethylierten Verbindung; EI 70 eV)
m/z (rel.Int.): 530 (M^+; 9%), 515(14), 499(43), 483(10), 452(19), 427(8), 421(16), 407(20), 369(19), 367(27), 355(100), 341(67), 327(37), 325(32), 323(33), 311(42), 297(37), 101(85), 88(166), 75(62), 71(82), 45(92)

6. Orientin (Flavonoid 6)

$C_{21}H_{20}O_{11}$

DC: R_f 0.60 (LM XVII)

$$\frac{R_f \text{ Vitexin}}{R_f \text{ Orientin}} = 1.13 \text{ (LM XVII)}$$

HPLC: Rt. 4.4 min (TS 10)

$$\frac{\text{Rt. Vitexin}}{\text{Rt. Orientin}} = 1.39 \text{ (TS 10)}$$

7. Isoorientin (Flavonoid 7)

$C_{21}H_{20}O_{11}$

DC: R_f 0.48 (LM XVII)

$$\frac{R_f \text{ Vitexin}}{R_f \text{ Isoorientin}} = 1.42 \text{ (LM XVII)}$$

HPLC: Rt. 4.1 min (TS 10)

$$\frac{\text{Rt. Vitexin}}{\text{Rt. Isoorientin}} = 1.49 \text{ (TS 10)}$$

8. Cucurbitacin R-2-O-glucosid (C.t. IV; Glykosid 1)

$C_{36}H_{56}O_{12}$

Smp.: 165-170°C (Lit. (109): 160-161°C)

DC: R_f 0.10 (LM II; vgl. Abb. 35, S. 78)

HPLC: Rt. 11.39 min (TS 1; vgl. Abb. 20, S. 43)

$$\frac{\text{Rt. Glykosid 1}}{\text{Rt. p-Hydroxybenzoesäureethylester (Rt. 13.0)}} = 0.88 \text{ (TS 1)}$$

UV: (Acetonitril/Wasser) nur Endabsorption

IR: (KBr) ν = 3420 (OH), 2960 (CH), 1710, 1690 (C=O), 1460, 1370, 1210, 1080, 1020 cm^{-1}

DCI-MS(Ammoniak): m/z (rel.Int.): 681($(M+H)^+$; 7%), 680(12), 662(2), 520(4), 502(2), 352(2), 198(28), 180(49), 149(64), 148(81), 132(100), 130(95)

9. Cucurbitacin R (C.t. V; Aglykon 1)

$C_{30}H_{46}O_7$

Smp.: 127-130°C (Lit. (110): 123-126°C)

DC: R_f 0.53 (LM II; vgl. Abb. 35, S. 78)

HPLC: Rt. 17.40 min (TS 1; vgl. Abb. 20, S. 43)

$$\frac{\text{Rt. Aglykon 1}}{\text{Rt. p-Hydroxybenzoesäureethylester (Rt. 13.0)}} = 1.34 \text{ (TS 1)}$$

UV: (Acetonitril/Wasser) nur Endabsorption

IR: (KBr) ν = 3450 (OH), 2970 (CH), 1710, 1695 (C=O), 1465, 1390, 1370, 1260, 1210, 1125, 1030, 985 cm^{-1}

FAB(-)-MS: m/z (rel.Int.): 517($(M-H)^-$; 100%), 500(23), 499(22), 483(5), 343(5), 275(5)

FAB(+)-MS: 501($(M-18+H)^+$; 100%), 485(48), 467(19), 277(78)

EI-MS(70 eV): m/z 500, 482, 403, 385, 369, 343, 325, 237, 219, 189, 187, 166, 142, 113, 87, 43

10. 23,24-Dihydrocucurbitacin B-2-O-glucosid (C.t. VI; Glykosid 2)

$C_{38}O_{58}H_{13}$

Smp.: 154-160°C (Lit. (109): 140-143°C)

DC: R_f 0.22 (LM II; vgl. Abb. 35, S. 78)

HPLC: Rt. 20.75 min (TS 1; vgl. Abb. 20, S. 43)

$$\frac{\text{Rt. Glykosid 2}}{\text{Rt. p-Hydroxybenzoesäureethylester (13.0 min)}} = 1.60 \text{ (TS 1)}$$

UV: (Acetonitril/Wasser) nur Endabsorption

IR: (KBr) ν= 3450 (OH), 2980, 2940 (CH), 1715 (C=O), 1455, 1435, 1370, 1265, 1210, 1125, 1080, 1025 cm^{-1}

DCI-MS(Ammoniak): m/z (rel.Int.): 722(2%), 682(2), 680(7),662(8), 502(2), 484(2), 408(3), 391(2), 212(23), 198(29), 180(52), 160(42), 130(81), 113(100)

11. 23,24-Dihydrocucurbitacin B (C.t. X; Aglykon 2)

$C_{32}H_{48}O_8$

Smp.: 116-120°C (Lit. (101): 163.5-164.5°C)

DC: R_f 0.83 (LM II; vgl. Abb. 35, S. 78)

HPLC: Rt. 29.65 min (TS 1; vgl. Abb. 20, S. 43)

$$\frac{\text{Rt. Aglykon 2}}{\text{Rt. p-Hydroxybenzoesäureethylester (13.0 min)}} = 2.28 \text{ (TS 1)}$$

UV: (Acetonitril/Wasser) nur Endabsorption

IR: (KBr) ν= 3460 (OH), 2980 (CH), 1710 (C=O), 1460, 1365, 1250, 1205, 1120, 1020, 980 cm^{-1}

DCI-MS(Isobutan): m/z (rel.Int.): 501($(M-HOAc+H)^+$; 100%), 483(4), 403(4), 391(5), 195(6), 163(6), 117(23), 113(18), 102(12)

EI-MS(70 eV): m/z 501, 500, 482, 403, 385, 360, 177, 166, 142, 113, 95, 69, 55, 43

^{13}C-NMR: (10 mg; C_5D_5N; 50.3 MHz)
ppm-Werte siehe Tabelle 10, S. 101

12. 23,24-Dihydroisocucurbitacin B (C.t. XII)

$C_{32}H_{48}O_8$

DC: R_f 0.88 (LM II; vgl. Abb. 35, S. 78)

HPLC: Rt. 32.34 min (TS 1; vgl. Abb. 20, S. 43)

$$\frac{\text{Rt. C.t. XII}}{\text{Rt. p-Hydroxybenzoesäureethylester (13.0 min)}} = 2.49 \text{ (TS 1)}$$

UV: (Acetonitril/Wasser) nur Endabsorption

FAB(-)-MS: m/z (rel.Int.): 559($(M^+-H)^-$; 12%), 499(100), 481(30), 465(7), 413(10), 343(14), 325(18), 311(15), 265(13)

EI-MS(70 eV): m/z: 500($(M-HOAc)^+$), 482, 449, 403, 385, 360, 177, 166, 113, 95, 69, 43

VIII. Herkunft der Vergleichssubstanzen

1. Cucurbitacine

siehe Kapitel 1, II., S. 157f

2. Flavonoide

Spinosin: Prof.W.S.Woo, Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul, Korea

Die übrigen Flavonoide stammten aus Beständen unseres Institutes.

Kapitel 3:

I. Herkunft der Drogen

Crotonöl	Fa.Mainland, Frankfurt/Main Kontroll-Nr. 01112 und 92911
Euphorbia canariensis L. (oberird.Teil)	La Palma, Kanarische Inseln (Frühjahr 1981)
Euphorbia cyparissias L. (oberird.Teile)	gesammelt im Gebiet des Heubergs bei Rosenheim (Oktober 1982)
Mezerei cortex	Fa.MÜGGENBURG, Hamburg (Typmuster 3172)

II. Herkunft der Vergleichssubstanzen

Phorbolmyristatacetat	Fa.SIGMA,Nr. P-8139
12-Desoxyphorbol-13-isobutyrat 4α-Phorbol Daphnetoxin Ingenol-3-angelat 6,20-Epoxylathyrol	Prof.Dr.E.Hecker, Deutsches Krebsforschungs- zentrum, Heidelberg
12-O-Palmityl-13-O-acetyl-16-hydroxyphorbol	Prof.Dr.T.Okuda, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Japan

III. Allgemeine Arbeitsmethoden

1. Dünnschichtchromatographie

1.1. Adsorbentien für die analytische DC

Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten, Schichtdicke 0.25 mm(Merck)
Kieselgel 60 F_{254}-HPTLC-Fertigplatten für die Nano-DC(Merck)

1.2. Adsorbentien für die präparative DC

Kieselgel 60 F_{254}-Fertigplatten, Schichtdicke 0.5 mm(Merck)

1.3. Auftrageweise bei der analytischen DC

Von den angereicherten Extrakten wurden ca. 50 µg bandförmig 0.5 - 1 cm breit aufgetragen.

1.4. Laufmittel für Diterpenester

LM XVIII Dichlormethan-Aceton 3:1 (für Crotonharz (184) und allg.)

LM XIX Chloroform-Diethylether 95:5 (für die lipophilen Komponenten im Crotonharz) (168)

1.5. Detektion

Fluoreszenzminderung

Die meisten der untersuchten Diterpenester besitzen konjugierte Doppelbindungen und können deshalb auf entsprechenden DC-Platten durch ihre Fluoreszenzminderung erkannt werden.

60%ige Schwefelsäure

Nach Besprühen und anschließendem Erhitzen (120°C/15 min) erscheinen Phorbolester als rötlichbraune Zonen im Tageslicht und gelbbraun fluoreszierend im UV 365 nm (168).

Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz

0.5 ml Anisaldehyd werden mit 10 ml Eisessig und 5 ml konz. Schwefelsäure in 85 ml Methanol gelöst.
Die Platte wird kräftig besprüht und 5 - 10 min im Trockenschrank bei 100°C erhitzt. Die Diterpenester erscheinen als blaugraue Zonen im Tageslicht.

2. Hochleistungsflüssigchromatographie

2.1. Technische Daten

Die analytischen und semipräparativen Arbeiten wurden auf den schon für die Kapitel 1 und 2 beschriebenen Anlagen durchgeführt (siehe S.163f und S. 173).

Für die präparative Trennung von Crotonharz wurden folgende Geräte verwendet:
Pumpe: Prep LC 500 (Waters GmbH,Königstein)
Detektor: Altex 151 Festwellenlängenphotometer
Schreiber: Recorder 56 (Perkin-Elmer,Überlingen)

2.2. Trennsysteme (TS)

2.2.1. Analytische HPLC

TS 11 (für die Trennung der Phorbolester im Crotonharz)
Säule: µ-Bondapak^{R}C18 (10µ) (300 x 4 mm ID)(Waters GmbH)
Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser 20:80
B: Acetonitril
Gradient: von 0% B nach 100% B in 72 min; linearer Anstieg
Durchfluß: 2.0 ml/min
Detektion: 220 nm (range 0.16)

TS 12 (für die Trennung von Cr VI)
Säule: LiChrosorb^{R}RP2/RP8 (1:1) (10µ) (300 x 4 mm ID)
(von uns selbst gepackt)
Fließmittel: Methanol-Wasser 70:30
Durchfluß: 2.0 ml/min
Detektion: 220 nm (range 0.16)

TS 13 (für die Trennung der Phorbolester in Croton tiglium Urtinktur)
Säule: LiChrosorb^{R}RP18 (5µ) (125 x 4 mm ID) (Merck)
Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser 45:55
B: Acetonitril
Gradient: von 0% B auf 100% B in 30 min; linearer Anstieg
Durchfluß: 1.0 ml/min
Detektion: 220 nm (range 0.16)

TS 14 (für die Trennung der Diterpenester der Extrakte aus Euphorbia canariensis und Daphne mezereum)
Säule: µ-Bondapak^{R}C18 (10µ) (300 x 4 mm ID) (Waters GmbH)
Fließmittel: A: Acetonitril-Wasser 20:80
B: Acetonitril
Gradient: von 0% B nach 100% B in 30 min; linearer Anstieg
Durchfluß: 2.0 ml/min
Detektion: 220 nm (range 0.04)

2.2.2. Präparative HPLC

PTS 6 (für die Fraktionierung von Crotonharz)
Säule: 55 x 2.5 cm ID Stahlsäule, gefüllt mit PrepPak^{R}C18-Material (60µ) (Waters GmbH)

Fließmittel: A: Methanol-Wasser 66.6:33.3
B: Methanol-Wasser 80:20
C: Methanol
Gradient: Stufengradient: bis 35 min A; bis 76 min B; dann C
Durchfluß: 50 ml/min
Detektion: 254 nm

PTS 7 (für die Isolierung von Cr I und Cr II)
Säule: µ-Bondapak^{R}C18 (10µ) (300 x 7.9 mm ID) (Waters GmbH)
Fließmittel: Methanol-Wasser 70:30
Durchfluß: 3.0 ml/min
Detektion: 220 nm (range 0.1)

PTS 8 (für die Isolierung von Cr III)
Säule, Fließmittel und Detektion wie bei PTS 7
Durchfluß: 4.0 ml/min

PTS 9 (für die Isolierung von Cr IV)
Säule: µ-Bondapak^{R}C18 (10µ) (300 x 7.9 mm ID)(Waters GmbH)
Fließmittel: Methanol-Wasser 80:20
Durchfluß: 2.0 ml/min
Detektion: 220 nm (range 0.1)

PTS 10 (für die Isolierung von Cr VI)
Säule, Durchfluß und Detektion wie bei PTS 9
Fließmittel: Methanol-Wasser 7:1

PTS 11 (für die Isolierung von Cr VII)
Säule, Durchfluß und Detektion wie bei PTS 9
Fließmittel: Methanol-Wasser 90:10

PTS 12 (für die Isolierung von Cr VIII)
Säule, Durchfluß und Detektion wie bei PTS 9
Fließmittel: Methanol-Wasser 92:8

PTS 13 (für die Isolierung von Cr IX)
Säule, Durchfluß und Detektion wie bei PTS 9
Fließmittel: Methanol-Wasser 95:5

2.3. Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel waren ChromAR-Qualität der Fa.Promochem, Wesel.

2.4. Zubereitung der Probenlösungen

Die Proben wurden in Methanol gelöst und zum Entfernen der Schwebstoffe membranfiltriert (Porendurchmesser 0.45 µm) oder zentrifugiert.

In der analytischen Arbeitsweise wurden ca. 50 - 100 µg Extrakt, gelöst in 10 µl, eingespritzt, bei der semipräparativen HPLC ca. 10 mg in 100 µl und bei der präparativen HPLC 500 mg, gelöst in 4 ml.

3. Gaschromatographie

3.1. Technische Daten

Die gaschromatographischen Analysen wurden auf einem SIGMA 1B und einem 3920 Gaschromatographen der Fa.Perkin-Elmer, Überlingen, durchgeführt.

3.2. Trennsysteme (GC-TS)

GC-TS 1 (für Fettsäuremethylester)
Gerät: SIGMA 1B
Säule: 25 m Quarzglaskapillarsäule f.s. OV 101
Trägergas: Stickstoff (3 ml/min)
Ofentemperaturprogramm: von 60°C (5 min) mit 15°/min auf 270°C
Einspritzblock: Gerstelteiler (270°C)
Detektor: FID (270°C)

GC-TS 2 (für die Unterscheidung der ungesättigten C18-Säuren)
Gerät: Gaschromatograph 3920
Säule: 25 m Quarzglaskapillarsäule f.s. Carbowax 20M
(Da dieser Gaschromatograph nicht für Kapillarsäulen ausgelegt war, war die Peakschärfe, bedingt durch die Totvolumina, nicht optimal)
Trägergas: Argon
Ofentemperatur: 210°C isotherm
Einspritzblock: 250°C
Detektor: FID (250°C)

4. Massenspektrometrie

Die DCI-Massenspektren wurden von Herrn Priv.-Doz. Dr.Stöckigt, an unserem Institut, Lehrstuhl Prof.Dr. Zenk, auf einem Massenspektrometer MAT 44S (Fa.Finnigan) aufgenommen. Reaktantgas war Isobutan.

IV. Spezielle Arbeitsmethoden

1. Isolierung der Phorbolester aus Crotonöl

1.1. Gewinnung von Crotonharz

88.5 g Crotonöl wurden viermal mit 100 ml 90%igem Methanol ausgeschüttelt. Die methanolischen Lösungen wurden vereinigt und, nachdem sie sich geklärt hatten, filtriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Es verblieben 6.3 g eines gelblichen Harzes (Crotonharz).

1.2. Fraktionierung von Crotonharz mit präparativer HPLC

1 g Crotonharz wurde in 8 ml Methanol gelöst und in zwei Durchgängen mit präparativer HPLC (PTS 6) in jeweils 11 Fraktionen getrennt (vgl.Abb. 58, S. 130). Diese wurden am Rotationsverdampfer bei 40°C auf die Hälfte eingeengt und anschließend gefriergetrocknet. Fraktion 1 und 2, 5 und 6, 8 und 9, sowie 10 und 11 wurden nach der analytischen Überprüfung vereinigt und als Fraktion 1, 5, 8 bzw. 10 weiteruntersucht.

1.3. Reinigung der Fraktionen mit semipräparativer HPLC

Es wurden nur die Fraktionen weiter bearbeitet, die in größerer Menge vorlagen.

Die Fraktionen wurden in möglichst kleinen Volumina Methanol gelöst und in Durchgängen von jeweils 1 - 10 mg eingespritzt. Die Peaks wurden anhand des Detektorsignals fraktioniert, die Eluate am Rotationsverdampfer schonend zur Trockne eingeengt. Es verblieb jeweils ein harzartiger Rückstand.

Aus Fraktion 3 wurden mit dem semipräparativen Trennsystem PTS 7 in acht Durchgängen insgesamt 12.5 mg Cr I und 3.0 mg Cr II isoliert.
Aus Fraktion 4 erhielten wir durch HPLC-Isolierung (PTS 8) insgesamt 7.0 mg Cr III.
Fraktion 5 wurde im PTS 9 semipräparativ getrennt. Cr IV ließ sich daraus allerdings nur anreichern.
Aus Fraktion 7 konnten wir mit dem PTS 10 insgesamt 16.7 mg Cr VI isolieren.
Fraktion 8 ergab 9.9 mg Cr VII (PTS 11).
Aus Fraktion 10 isolierten wir mit PTS 12 insgesamt 19.1 mg Cr VIII, wobei die entsprechende Zone mittels präparativer Schichtchromatographie (LM XVIII) vorher aus Fraktion 10 angereichert worden war.

1.4. Gewinnung von Cr IX

299.3 mg Crotonharz wurden in Aceton gelöst und auf 5 Kieselgel-Fertigplatten (Schichtdicke 0.5 mm) aufgetragen. Die Platten wurden im LM XIX entwickelt und dann die im UV 254 nm markierte Zone Y1 (vgl. Abb. 55, S. 124) abgekratzt und mit Methanol eluiert. Das Eluat wurde filtriert und zur Trockne eingeengt (15.5 mg). Der Rückstand wurde in 400 µl Methanol gelöst und im PTS 13 mit HPLC gereinigt. Es resultierten 2.4 mg Cr IX.

2. Herstellung der Fettsäuremethylester

In Anlehnung an eine Vorschrift von VAN WIJNGAARDEN (186) wurden in einem 25 ml Rundkolben ca. 1 mg Phorbolester mit 2.0 ml 0.5 N-methanolischer KOH 5 min unter Rückfluß gekocht. Nach Zugabe von 4.0 ml 20%igem Bortrifluorid in Methanol (Merck) wurde weitere 2 min erhitzt. Dann gaben wir 3.0 ml n-Pentan zu und kochten nochmals 2 min. Die Pentanschicht wurde nach dem Abkühlen mit einer gesättigten Natriumchloridlösung in den Kolbenhals getrieben, abpipettiert, über Natriumsulfat getrocknet und durch Einblasen von Stickstoff auf ca. ein Fünftel eingeengt. An-

schließend wurden 2 µl Nonan (Merck) als Innerer Standard zugegeben. Von dieser Lösung wurde 1 µl in den GC eingespritzt.

3. Herstellung diterpenesterhaltiger Pflanzenextrakte

3.1. Extraktion des Latex von Euphorbia canariensis

Der nach Anstechen der Pflanze austretende Milchsaft wurde in Methanol aufgefangen. Die anschließende Extraktion folgte einer Vorschrift von EVANS (131): Die methanolische Suspension des Latex wurde schonend zur Trockne eingeengt (510 mg) und dann dreimal mit 40 ml Aceton digeriert. Die vereinigten Acetonextrakte wurden filtriert und zur Trockne eingedampft (255 mg). Das verbleibende glasige Harz wurde in 50 ml Methanol-Wasser (3:1) suspendiert und dreimal mit 50 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Anschließend wurde zur wässrigen Phase 50 ml 1%ige NaCl-Lösung zugesetzt und dreimal mit 50 ml Diethylether ausgeschüttelt. Da die Etherlösung farblos war, wurde auf eine Natriumcarbonatausschüttelung verzichtet. Die Etherlösung wurde getrocknet und einrotiert. Es verblieben 7 mg glasiges Harz, das wir für die Analyse verwendeten.

3.2. Extraktion von Euphorbia cyparissias

Die grünen, unverholzten, milchsaftführenden oberirdischen Teile von Euphorbia cyparissias (223.7 g) wurden im Sorvall^{R} Omnimix mit der dreifachen Menge Aceton ca. 30 sec extrahiert. Die Acetonlösung wurde abfiltriert und zur Trockne eingedampft (4.4 g), der Rückstand in 100 ml Methanol-Wasser (3:1) suspendiert und dreimal mit 50 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Die Hexanphasen wurden verworfen. Die wässrige Phase wurde nach Zugabe von 100 ml 1%iger NaCl-Lösung dreimal mit 100 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherphasen wurden dreimal mit 200 ml 1%iger Na_2CO_3-Lösung ausgeschüttelt, die verbleibende Etherphase über Natriumsulfat getrocknet und dann eingeengt. Es verblieben 47.4 mg gelbes Harz, das mit DC und HPLC analysiert wurde.

3.3. Extraktion von Mezerei cortex

31.1 g pulverisierte Droge wurden 24 Stdn. mit 500 ml Aceton unter öfterem Umschütteln mazeriert. Nach dem Abfiltrieren wurde die Acetonlösung zur Trockne eingeengt und der Rückstand (1.7 g) in 40 ml Methanol-Wasser (3:1) suspendiert. Zum Entfernen der Lipide wurde achtmal mit 40 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 1%iger NaCl-Lösung (1:1) versetzt und viermal mit 40 ml Diethylether ausgeschüttelt. Die dunkelbraunen Etherauszüge wurden durch viermalige Verteilung mit 100 ml 1%iger Natriumcarbonatlösung von den Säuren und phenolischen Verbindungen befreit. Die verbleibende gelbgefärbte Etherphase wurde getrocknet und dann eingeengt. Es verblieben 0.1 g gelbgrüner Rückstand, der in Methanol gelöst für die Analyse verwendet wurde.

V. Ergebnisse bei der Identifizierung der Phorbolester aus Crotonöl

1. Bestimmung der Fettsäuren mit GC

Die Fettsäuren wurden als Methylester gaschromatographisch analysiert und durch Vergleich mit den rel. Retentionszeiten von Referenzsubstanzen (Merck) unter Verwendung von Nonan als Innerem Standard identifiziert.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 13, S. 134, aufgelistet.

2. Massenspektren

Mit DCI-MS (Reaktantgas: Isobutan) konnten folgende Massenspektren erhalten werden (m/z (rel.Int.)):

Cr I: 489 (M^+ +1; 2%), 471(7), 389(24), 371(10), 329(2), 311(14), 293(18), 117(27), 100(100)

Cr II: 473 (M^+ +1; 14), 455(3), 373(10), 355(8), 313(5), 295(7), 173(10), 117(100), 100(32)

Cr III: 517 (M^+ +1; 1), 499(1.5), 417(10), 399(5), 329(3), 311(6), 293(3), 201(4), 100(100)

Cr VI: 573 (M^+ +1; 1), 555(1.5), 473(20), 455(7), 329(15), 311(100), 293(12)
561 (M^+ +1; 1.5), 543(3), 501(12), 483(7), 389(25), 371(22), 353(3), 329(15), 311(100), 293(12)

Cr VII: 501, 483, 389, 371, 329, 311, 229, 201, 191, 173, 149, 146, 119, 117, 113

Cr VIII: 617 (M^+ +1; 2), 599(4), 389(75), 271(38), 329(6), 311(100), 293(6), 229(80)

Cr IX: 751 (M^+ -17; 0.5), 651(0.5), 471(0.2), 453(0.5), 411(0.2), 371(1.5), 353(1), 337(0.7), 329(0.5), 311(1), 293(1.5), 281(13), 113(17), 100(100)

A N H A N G

Statistische Definitionen

x_i : Meßwert

n : Anzahl der Meßwerte

$\bar{x}$: Mittelwert aller Meßwerte

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$: Varianz mit (n-1)Gewichtung

$$s = \sqrt{s^2}$$: Standardabweichung

$$\Delta\bar{x} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$: Standardfehler des Mittelwertes

$$s_{rel} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100(\%)$$: relative Standardabweichung

Abkürzungen

DAB 6	Deutsches Arzneibuch, 6. Ausgabe 1926
Erg.B.6	Ergänzungsbuch zur 6. Ausgabe des Deutschen Arzneibuches
HAB 1934	Homöopathisches Arzneibuch 1934
HAB 1	Homöopathisches Arzneibuch, 1. Ausgabe 1978 mit 1. Nachtrag 1981

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) LAVIE, D. und E.GLOTTER: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 29, 307 (1971)
2) BALLIANO, G., O.CAPUTO, F.VIOLA, L.DELPRINO und L.CATTEL: Phytochemistry 22, 915 (1983)
3) REHM, S.: in Ergebnisse der Biologie, Ed. H.Artrum et al., Bd. 22, S. 108, Springer-Verlag, Berlin 1960
4) SCHNEIDER, W.: Lexikon der Arzneimittelgeschichte, Band V Pflanzliche Drogen, Govi-Verlag GmbH, Frankfurt a.M. 1974
5) LAVIE, D., D.WILLNER und Z.MERENLENDER: Phytochemistry 3, 51 (1964)
6) TORRES, D.M.G.: Catalogo de plantas medicinales usadas en Paraguay, Asuncion-Paraguay 1981
7) Homöopathisches Repetitorium, Deutsche Homöopathie-Union, Karlsruhe 1981
8) HOPPE, H.A.: Drogenkunde, Bd. 1, Walter de Gruyter-Verlag, Berlin-New York 1975
9) HAGER's Handbuch der pharmazeutischen Praxis, Hrsg. P.List und L.Hörhammer, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg/New York 1975
10) LAVIE, D. und S.SZINAI: J.Amer.Chem.Soc. 80, 707 (1958)
11) BANERJEE, S.P. und P.C.DANDIYA: J.Pharm.Sci. 56, 1665 (1967)
12) LE MEN, J., G.BUFFARD, J.PROVOST, R.TIBERGHIEN, P.FORGACS, E.LAGRANGE und O.ALBERT: Chim.Ther. 4, 459 (1969)
13) GITTER, S., B.GALLILY, B.SHOHAT und D.LAVIE: Cancer Res. 21, 516 (1961)
14) GALLILY, B., B.SHOHAT, J.KALISH, S.GITTER und D.LAVIE: Cancer Res. 22, 1038 (1962)
15) STRAUCH, H. und K.HILLER: Pharmazie 29, 656 (1974)
16) CORDELL, G.A.: in Progress in Phytochemistry Vol. 5, Ed. by L.Reinhold, J.B.Harborne and T.Swain, Pergamon Press, Oxford-New York-Toronto-Sydney-Paris-Frankfurt 1978, S. 286
17) CASSADY, J.M. und M.SUFFNESS: Medicinal Chemistry 16, 201 (1980)
18) WHITEHOUSE, M.W. und R.W.DOSKOTCH: Biochem.Pharmacol. 18, 1790 (1969)
19) KONOPA, J., A.MATUSZKIEWICZ, M.HRABOWSKA und K.ONOSZKA: Arzneim.-Forsch. 24, 1741 (1974)
20) HAN, Te-Wu, Hsueh-Hui MA, Yuan-Chang CHAO und Liang-Mei CHOU: Chung-Hua I Hsueh Tsa Chih. 59, 206 (1979); C.A. 92, 209055r (1980)
21) SHOHAT, B., A.M.BEEMER, S.GITTER und D.LAVIE: Experientia 28, 1203 (1972)
22) ALBERT, O., T.DJETCHA, E.LAGRANGE, M.AUROUSSEAU, P.FORGACS, J.PROVOST und R.TIBERGHIEN: Chim.Ther. 5, 205 (1970)
23) EDERY, H., G.SCHATZBERG-PORATH und S.GITTER: Arch.intern. pharmacodyn. 130, 315 (1961)
24) MÜLLER, A. und M.WICHTL: Pharm.Ztg. 124, 1761 (1979)
25) NIELSEN, J.K., L.M.LARSEN und H.SØRENSEN: Phytochemistry 16, 1519 (1977)
26) METCALF, R.L., R.A.METCALF und A.M.RHODES: Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A. 77, 3769 (1980)

27) CHAMBLISS, O.L. und C.M.JONES: Science 153, 1392 (1966)
28) GUHA, J. und S.P.SEN: Nature New Biology 244, 223 (1973)
29) HERRMANN, K.: Z.Lebensm.Unters.-Forsch. 165, 87 (1977)
30) STEYN, D.G.: S.Afr.med.J. 24, 713 (1950)
31) REHM, S., P.R.ENSLIN, A.D.J.MEEUSE und J.H.WESSELS: J.Sci. Food Agric. 8, 679 (1957)
32) GMELIN, R.: Arzneim.-Forsch. 13, 771 (1963)
33) GMELIN, R.: Arzneim.-Forsch. 14, 1021 (1964)
34) ZIELINSKI, J. und J.KONOPA: J.Chromatogr. 36, 540 (1968)
35) KLOSS, P. und H.SCHINDLER: Pharm.Ztg. 111, 772 (1966)
36) GMELIN, R.: Arch.Pharm. 300, 234 (1967)
37) SILAPA-ARCHA, W. und P.J.HYLANDS: Varasarn Paesachasarthara 7, 41 (1980); C.A. 95, 38277 (1981)
38) MURTY, B.S.R., T.N.VASUDEVAN und M.L.KHORANA: Indian J. Pharm. 32, 10 (1970)
39) SHARMA, G.C. und C.V.HALL: J.Am.Soc.Hort.Sci. 96, 750 (1971)
40) METCALF, R.L., A.M.RHODES, R.A.METCALF, J.FERGUSON, E.R. METCALF und P.-Y.LU: ENVIRON.Entomol. 11, 931 (1982)
41) DARWISH-SAYED, M., S.I.BALBAA und M.S.AFIFI: Planta medica 26, 293 (1974)
42) BALBAA, S.I., A.Y.ZAKI und S.M.EL-ZALABANI: Egypt.J.Pharm. Sci. 20, 221 (1979)
43) KANNAIYAN, S. und D.PURUSHOTHAMAN: Madras Agric.J. 60, 614 (1973)
44) AUTERHOFF, H. und R.MÜLLER: Dtsch.Apoth.Ztg. 107, 1353 (1967)
45) LAZUREVSKII, G.V., P.K.KITNYA, I.P.DRAGALIN, N.I.MASHCHENKO, T.V.DEMAKOVA und L.I.GUSEVA: UdSSR Pat. 539.553 (1976); C.A. 86, 103301d (1977)
46) VAN KEULEN, H.A.: Qual.Plant.-Plant Foods Hum.Nutr. 31, 129 (1981)
47) MÜLLER, A.: Dissertation, Marburg 1979
48) KUPCHAN, S.M., G.TSOU und C.W.SIGEL: J.Org.Chem. 38, 1420 (1973)
49) BALLIANO, G., O.CAPUTO, F.VIOLA, L.DELPRINO und L.CATTEL: Phytochemistry 22, 909 (1983)
50) RIPPERGER, H.: Tetrahedron 32, 1567 (1976)
51) SEIFERT, K., H.BUDZIKIEWICZ und K.SCHREIBER: Pharmazie 31, 816 (1976)
52) CURTIS, P.J. und P.M.MEADE: Phytochemistry 10, 3081 (1971)
53) KUPCHAN, S.M., R.M.SMITH, Y.AYNEHCHI und M.MARUYAMA: J.Org. Chem. 35, 2891 (1970)
54) METZ, H.: Naturwissenschaften 48, 569 (1961)
55) KONOPA, J., J.ZIELINSKI und A.MATUSZKIEWICZ: Arzneim.-Forsch. 24, 1554 (1974)
56) ELGASS, H., A.MAUTE, R.MARTIN und S.GEORGE: Labor Praxis 6, 2 (1982)
57) EL KHADEM, H. und M.M.A.ABDEL RAHMANN: J.Chem.Soc. 4991 (1963)
58) ENSLIN, P.R., F.J.JOUBERT und S.REHM: J.Sci.Food Agric. 7, 646 (1956)
59) TSCHESCHE, R., G.BIERNOTH und G.SNATZKE: Liebigs Ann.Chem. 674, 196 (1964)
60) LE MEN, J., P.POTIER, H.-P.HUSSON und P.FORGACS: Ann.Pharm. Franc. 26, 779 (1968)
61) KRUG, J.: Dissertation, TH Braunschweig 1934

62) KLOSS, P.: Arch.Pharm. 299, 351 (1966)
63) MATOS, F.J.A. und O.R.GOTTLIEB: An.Acad.Bras.Cienc. 39, 245 (1967); C.A. 68, 112137 (1968)
64) GMELIN, R.: Planta medica 14, Suppl. 119 (1966)
65) BREDENBERG, J.B.-Son und R.GMELIN: Acta Chem.Scand. 16, 1802 (1962)
66) LAVIE, D. und D.WILLNER: J.Am.Chem.Soc. 80, 710 (1958)
67) LAVIE, D., Y.SHVO, O.R.GOTTLIEB und E.GLOTTER: J.Org.Chem. 27, 4546 (1962)
68) LAVIE, D., Y.SHVO, O.R.GOTTLIEB und E.GLOTTER: J.Org.Chem. 28, 1790 (1963)
69) RAO, M.M. und D.LAVIE: Tetrahedron 30, 3309 (1974)
70) RAO, M.M., H.MESHULAM und D.LAVIE: J.Chem.Soc. Perkin I, 22, 2552 (1974)
71) SEIFERT, K. und M.H.A.ELGAMAL: Pharmazie 32, 605 (1977)
72) POHLMANN, J.: Phytochemistry 14, 1587 (1975)
73) KONOPA, J., E.JERECZEK-MORAWSKA, A.MATUSZKIEWICZ und T.NAZAREWICZ: Neoplasma 3, 335 (1966)
74) PANOSYAN, A.G., M.N.NIKISHENKO, V.A.MNATSAKANYAN und S.A.VARTANYAN: IUPAC-Symp.Paper 2, 117 (1978)
75) PANOSYAN, A.G., M.N.NIKISHENKO, V.A.MNATSAKANYAN und V.L.SADOVSKAYA: Bioorg.Khim. 5, 721 (1979); C.A. 91, 71693t (1979)
76) TUNMANN, P. und G.STAPEL: Arch.Pharm. 299, 596 (1966)
77) BIGLINO, G., J.M.LEHN und G.OURISSON: Tetrahedron Lett. 1651 (1963)
78) TUNMANN, P. und G.STAPEL: Naturwissenschaften 52, 661 (1965)
79) HYLANDS, P.J. und J.KOSUGI: Phytochemistry 21, 1379 (1982)
80) TUNMANN, P. und H.WIENECKE: Arch.Pharm. 293, 195 (1960)
81) DUNCAN, G.R., D.D.LEVI und R.PYTTEL: Planta medica 16, 224 (1968)
82) HYLANDS, P.J. und A.M.SALAMA: Phytochemistry 15, 559 (1976)
83) HYLANDS, P.J. und E.S.MANSOUR: Phytochemistry 21, 2703 (1982)
84) TITTEL, G.: Dissertation, Universität München 1978
85) LEITCH, R.E.: J.Chromatogr.Sc. 9, 531 (1971)
86) KUPCHAN, S.M., H.MESHULAM und A.T.SNEDEN: Phytochemistry 17, 767 (1978)
87) LEMEE, A.: Dictionnaire descriptif et synonymique des genres des plantes phanerogames, Vol. VIIIb, S. 806; Brest 1943
88) JEFFREY, C.: Kew Bulletin 25, 191 (1971)
89) MARTIUS, C.F.P. und A.G.EICHLER: Flora Brasiliensis, Vol.VI, Pars IV, S. 86, München 1878-1885
90) PECKOLT, Th.: Ber.dtsch.pharm.Ges. 14, 308 (1904)
91) BALBACH, A.: A Flora NACIONAL NA Medicina Domestica - Vol.II, 4.Edicao, Edicoes "A Edificacao Do Lar", Sao Paulo
92) MORS, W.B. und C.T.RIZZINI: Usefull Plants of Brazil, S.89; Holden-Day Inc., San Francisco, London, Amsterdam 1966
93) FREISE, F.W.: Perf.essent.oil rec. 22, 370 (1931)
94) EARLE, F.R. und Q.JONES: Economic Botany 16, 221 (1961)
95) HOPKINS, C.Y., M.J.CHISHOLM und J.A.OGRODNIK: Lipids 4, 89 (1969)
96) CHISHOLM, M.J. und C.Y.HOPKINS: Can.J.Biochem. 45, 1081 (1967)
97) PECKOLT, Th.: Arch.Pharm. 163, 104 (1863)
98) HEGNAUER, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen, Band 3, S. 620; Birkhäuser-Verlag, Basel und Stuttgart 1964

99) HEGNAUER, R.: Pharm.Acta Helv. 32, 334 (1957)
100) MÜLLER, R. und H.AUTERHOFF: Dtsch.Apoth.Ztg. 108, 1191 (1968)
101) KUPCHAN, S.M., A.H.GRAY und M.D.GROVE: J.Med.Chem. 10, 337 (1967)
102) AUDIER, H.E. und B.C.DAS: Tetrahedron Lett. 2205 (1966)
103) RAPP, U., G.MEYERHOFF und G.DIELMANN; Finnigan MAT Firmenschrift Nr. 47
104) BARBER, M., R.S.BORDOLI, R.D.SEDGWICK, A.N.TYLER, B.N.GREEN und V.C.PARR: VG Analytical publication Inside Nr. 10
105) RIPPERGER, H.: Z.Chem. 16, 322 (1976)
106) OKABE, H., Y.MIYAHARA, T.YAMAUCHI, K.MIYAHARA und T.KAWASAKI: Chem.Pharm.Bull. 28, 2753 (1980)
107) MIYAHARA, Y., H.OKABE und T.YAMAUCHI: Chem.Pharm.Bull. 29, 1561 (1981)
108) SCHULTEN, H.-R. und D.E.GAMES: Biomed.Mass Spectrometry 1, 120 (1974)
109) YAMADA, Y., K.HAGIWARA, K.IGUCHI, S.SUZUKI und H.-Y.HSU: Chem.Pharm.Bull. 26, 3107 (1978)
110) CATTEL, L., O.CAPUTO, L.DELPRINO und G.BIGLINO: Gazz.Chim. Ital. 108, 1 (1978)
111) YAMADA, Y., K.HAGIWARA, K.IGUCHI, Y.TAKAHASI und H.-Y.HSU: Phytochemistry 17, 1798 (1978)
112) YAMADA, Y., K.HAGIWARA, K.IGUCHI und S.SUZUKI: Tetrahedron Lett. 2099 (1977)
113) YAMADA, Y., K.HAGIWARA, K.IGUCHI, Y.TAKAHASHI und S.SUZUKI: Chemistry Lett. 319 (1978)
114) VANDE VELDE, V. und D.LAVIE: Tetrahedron 39, 317 (1983)
115) BULL, J.R., A.A.CHALMERS und P.C.COLEMAN: S.Afr.J.Chem. 32, 27 (1979)
116) The Flavonoids; Hrsg.: J.B.Harborne, T.J.Mabry und H.Mabry; Chapman and Hall, London 1975
117) The Flavonoids: Advances in Research; Hrsg.: J.B.Harborne und T.J.Mabry; Chapman and Hall, London-New York 1983
118) WAGNER, H., S.BLADT und E.M.ZGAINSKI: Drogenanalyse: Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1983
119) ROSPRIM, L.: Dissertation, Universität München 1966
120) TITTEL, G. und H.WAGNER in: Proceedings of the international Bioflavonoid Symposium München 1981, S. 299; Verlag der Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest 1982
121) MABRY, T.J., K.R.MARKHAM und M.B.THOMAS: The Systematic Identification of Flavonoids; Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1970
122) BOUILLANT, M.-L., J.FAVRE-BONVIN und J.CHOPIN: Phytochemistry 14, 2267 (1975)
123) WOO, W.S., S.S.KANG, S.H.SHIM, H.WAGNER, V.M.CHARI, O.SELIGMANN und G.OBERMEIER: Phytochemistry 18, 353 (1979)
124) MONTIES, B., M.-L.BOUILLANT und J.CHOPIN: Phytochemistry 15, 1053 (1976)
125) SAUNDERS, J.A. und J.W.McCLURE: Phytochemistry 15, 809 (1976)
126) BRANDT, L.: J.Haematol.Suppl. 2 (1967)
127) WAGNER, H., K.JURCIC und R.BAUER: unveröffentlichte Ergebnisse

128) ADOLF, W. und E.HECKER: Isr.J.Chem. 16, 75 (1977)
129) JACOBI, P., E.HÄRLE, H.U.SCHAIRER und E.HECKER: Liebigs Ann.Chem. 741, 13 (1970)
130) HECKER, E. und R.SCHMIDT: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 31, 377 (1974)
131) EVANS, F.J. und C.J.SOPER: Lloydia 41, 193 (1978)
132) EVANS, F.J. und S.E.TAYLOR: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 44, 1 (1983)
133) HECKER, E. in: H.Busch (Hrsg.), Methods in Cancer Research, Vol. VI, S. 439; Academic Press, New York, London 1971
134) VAN DUUREN, B.L.: Progr.exp.Tumor Res. 11, 31 (1969)
135) UPADHYAY, R.R. und E.HECKER: Phytochemistry 15, 1070 (1976)
136) STUART, K.L. und M.BARRETT: Tetrahedron Lett. 2399 (1969)
137) OHIGASHI, H. und T.MITSUI: Bull.Inst.Chem.Res.Kyoto University 50, 239 (1972)
138) TAYLOR, S.E., F.J.EVANS, M.A.GAFUR und A.K.CHOUDHURY: J.Nat.Prod. 44, 729 (1981)
139) EVANS, F.J.: Phytochemistry 16, 395 (1977)
140) EVANS, F.J.: Toxicon 16, 51 (1978)
141) FÜRSTENBERGER, G. und E.HECKER: Experientia 33, 986 (1977)
142) HANDA, S.S., A.D.KINGHORN, G.A.CORDELL und N.R.FARNSWORTH: J.Nat.Prod. 46, 123 (1983)
143) GUNASEKERA, S.P., A.D.KINGHORN, G.A.CORDELL und N.R. FARNSWORTH: J.Nat.Prod. 44, 569 (1981)
144) HECKER, E. in: H.Wagner und L.Hörhammer (Hrsg.), Pharmacognosy and Phytochemistry, S. 147, Springer-Verlag, Berlin 1971
145) SAKATA, K., K.KAWAZU, T.MITSUI und N.MASAKI: Tetrahedron Lett. 1141 (1971)
146) BERENBLUM, I.: Cancer Res. 1, 44 (1941)
147) HECKER, E.: Cancer Res. 28, 2338 (1968)
148) FÜRSTENBERGER, G. und E.HECKER: Planta medica 22, 241 (1972)
149) HECKER, E. in: T.J.Slaga, A.Sivak, R.K.Boutwell (Hrsg.), Carcinogenesis, Vol. 2, S. 11; Raven Press, New York, 1978
150) SOPER, C.J. und F.J.EVANS: Cancer Res. 37, 2487 (1977)
151) HARTWELL, J.L.: Lloydia 32, 153 (1969)
152) KUPCHAN, S.M., I.UCHIDA, A.R.BRANFMAN, R.G.DAILEY jr. und B.YU FEI: Science 191, 571 (1976)
153) KUPCHAN, S.M. und R.L.BAXTER: Science 187, 652 (1975)
154) KUPCHAN, S.M., J.G.SWEENY, R.L.BAXTER, T.MURAE, V.A. ZIMMERLY und B.R.SICKLES: J.Am.Chem.Soc. 97, 672 (1975)
155) KUPCHAN, S.M., Y.SHIZURI, W.C.SUMNER jr., H.R.HAYNES, A.P.LEIGHTON und B.R.SICKLES: J.Org.Chem. 41, 3850 (1976)
156) KUPCHAN, S.M., Y.SHIZURI, T.MURAE, J.G.SWEENY, H.R.HAYNES, M.-S.SHEN, J.C.BARRICK, R.F.BRYAN, D. VAN DER HELM und K.K.WU: J.Am.Chem.Soc. 98, 5719 (1976)
157) OGURA, M., K.KOIKE, G.A.CORDELL und N.R.FARNSWORTH: Planta medica 33, 128 (1978)
158) GUNASEKERA, S.P., G.A.CORDELL und N.R.FARNSWORTH: J.Nat. Prod. 42, 658 (1979)
159) YARKONI, E. und H.J.RAPP: J.Natl.Cancer Inst. 63, 503 (1979)
160) ABB, J., G.J.BAYLISS und F.DEINHARDT: J.Immunology 122, 1639 (1979)

161) GOLDFARB, R.H. und R.B.HERBERMAN: J.Immunology 126, 2129 (1981)
162) EVANS, F.J. und R.J.SCHMIDT: Inflammation 3, 215 (1979)
163) EVANS, F.J., R.J.SCHMIDT, A.D.KINGHORN: Biomed.Mass Spectr. 2, 126 (1975)
164) SCHMIDT, R. und E. HECKER: Cancer Res. 35, 1375 (1975)
165) KREIBICH, G., I.WITTE und E.HECKER: Z.Krebsforsch. 76, 113 (1971)
166) KREIBICH, G., R.SÜSS und V.KINZEL: Z.Krebsforsch. 81, 135 (1974)
167) ABO, K. und F.J.EVANS: Planta medica 43, 392 (1981)
168) EVANS, F.J. und A.D.KINGHORN: J.Chromatogr. 87, 443 (1973)
169) KINGHORN, A.D. und F.J.EVANS: J.Pharm.Pharmacol. 26, 408 (1974)
170) RAO, G.H.R., A.A.JACHIMOWICZ und J.G.WHITE: J.Chromatogr. 96, 151 (1974)
171) BERRY, D.L., M.R.LIEBER, S.M.FISCHER und T.J.SLAGA: Canc. Lett. 3, 125 (1977)
172) KINGHORN, A.D. und F.J.EVANS: J.Pharm.Pharmacol. 27, 329 (1975)
173) OCKEN, P.R.: J.Lipid Res. 10, 460 (1969)
174) MARSHALL, G.T. und A.D.KINGHORN: J.Chromatogr. 206, 421 (1981)
175) LIN, L.J., G.T.MARSHALL und A.D.KINGHORN: J.Nat.Prod. 46, 723 (1983)
176) UEMURA, D. und Y.HIRATA: Tetrahedron Lett. 2529 (1974)
177) HIRATA, Y.: Pure Appl.Chem. 41, 175 (1975)
178) ADOLF, W. und E.HECKER: Tetrahedron Lett. 2887 (1980)
179) DRIEDGER, P.E. und P.M.BLUMBERG: Cancer Res. 40, 339 (1980)
180) FALSONE, G., A.E.G.CREA und E.A.NOACK: Arch.Pharm. 315, 1026 (1982)
181) CHAVEZ, P.I., S.D.JOLAD, J.J.HOFFMANN und J.R.COLE: J.Nat.Prod. 45, 745 (1982)
182) MARSTON, A. und E.HECKER: Planta medica 47, 141 (1983)
183) HE, Xian-Guo, Fu-Xiang JIANG und Qian-Ru ZHOU: Acta botanica sinica 20, 76 (1978)
184) HECKER, E.: Planta medica 1968 Suppl. S. 24
185) ZECHMEISTER, K., F.BRANDL, W.HOPPE, E.HECKER, H.J.OPFERKUCH und W.ADOLF: Tetrahedron Lett. 4075 (1970)
186) VAN WIJNGAARDEN, D.: Anal.Chem. 39, 848 (1967)
187) FLASCHENTRÄGER, B. und R.VON WOLFFERSDORFF: Helv.Chim. Acta 17, 1444 (1934)
188) ARPINO, P.J. und G.DEVANT: Analusis 7, 348 (1979)
189) EVANS, F.J. und R.J.SCHMIDT: Phytochemistry 15, 333 (1976)
190) SCHMIDT, R. und E.HECKER: Fette Seifen Anstrichm. 73, 676 (1971)
191) SCHMIDT, R. und E.HECKER: Fette Seifen Anstrichm. 70, 851 (1968)
192) CLARKE, E. und E.HECKER: Z.Krebsforsch. 67, 192 (1965)
193) HECKER, E. und H.BRESCH: Z.Naturforsch. 20b, 216 (1965)
194) OTT, H.H. und E.HECKER: Experientia 37, 88 (1981)
195) STOUT, G.H., W.G.BALKENHOL, M.POLING, G.L.HICKERNELL: J.Amer.Chem.Soc. 92, 1070 (1970)

196) RONLAN, A., B.WICKBERG: Tetrahedron Lett. 4261 (1970)
197) HÖRHAMMER, H.P.: Dissertation, Universität München 1966
198) KREUTZKAMP, B.: Dissertation, Universität München, in Vorbereitung
199) SELIGMANN, O.: Dissertation, Universität München 1977
200) DOSKOTCH, R.W., M.Y.MALIK, J.L.BEAL: Lloydia 32, 115 (1969)
201) BLUMBERG, P.M.: C.R.C.Critical Reviews in Toxicology 8, 153 (1980-81)

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München angefertigt.

Für die Unterstützung, die mir bei der Durchführung dieser Arbei zuteil wurde, möchte ich meinen aufrichtigen Dank aussprechen:

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. H. Wagner, für das in mich gesetzte Vertrauen, die stete Unterstützung und großzügige Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. G. Tittel, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, für die vielen Tips aus seinem reichen chromatographischen Erfahrungsschatz.

Herrn Professor Dr. H. Teppner, Institut für Botanik der Universität Graz, Herrn Dr. J. Pohlmann, Botanischer Garten Hamburg, Herrn J.L.S. Keesing, Royal Botanic Gardens, Kew, England, Herrn Müller und Herrn Bogner, Botanischer Garten München, sowie allen Firmen für die freundliche Überlassung von Drogenmaterial.

Herrn Professor Dr. J.R. Bull, Nat.Chem.Res.Laboratory, Pretoria, Südafrika, Herrn Professor Dr. R.W. Doskotch, The Ohio State University, Columbus, USA, Herrn Professor Dr. E. Hecker, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Herrn Professor Dr. D. Lavie, The Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, Herrn Professor Dr. T. Okuda, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Japan, Herrn Dr. K. Seifert und Herrn Dr. H. Ripperger, Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle/Saale, DDR, Herrn Professor Dr. E.T. Sneden, Virginia Commonwealth University, Richmond, USA, sowie Herrn Professor Dr. M. Wichtl, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Marburg/Lahn, für die bereitwillige Überlassung von Vergleichssubstanzen.

Herrn Professor Dr. H. Achenbach, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Erlangen-Nürnberg und Herrn Privat-Dozent Dr. J. Stöckigt, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, Lehrstuhl Professor Dr.M.H. Zenk, sowie der Firma VG Instruments, Wiesbaden, für die Auf-

nahme der DCI- bzw. FAB-Massenspektren.

Herrn Privat-Dozent Dr. Wrackmeyer, Institut für Anorganische Chemie der Universität München, für die Aufnahme des ^{13}C-NMR-Spektrums.

Der Fa. Hewlett-Packard, Waldbronn, für die Möglichkeit zur Erprobung des HP 1040A-Photodiodenarray-Detektors.

Fräulein E. Keller für die Anfertigung der REM-Aufnahmen.

Herrn Dr. O. Seligmann für die NMR- und Massenspektren, sowie allen anderen Kolleginnen und Kollegen des Instituts, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau M. Seitz und Fräulein V. Schick, für die technische Assistenz, sowie Herrn J. Baumgartner für die bereitwillige Hilfe bei apparativen Problemen.

L E B E N S L A U F

Rudolf Franz Xaver	B a u e r geboren am 30. September 1956 in Obertaufkirchen
Eltern:	Franz Xaver Bauer, Landwirt, und Ursula Bauer, geb. Unterholzner
Konfession:	römisch-katholisch
Familienstand:	ledig
Schulbildung:	1962 - 1967 Volksschule Ranoldsberg 1967 - 1975 Ruperti-Gymnasium Mühldorf/Inn
Abitur:	Juni 1975 in Mühldorf/Inn
Grundwehrdienst:	1975 - 1976
Studium der Pharmazie:	WS 1976/77 bis WS 1979/80 Ludwig-Maximilians-Universität München
2.Prüfungsabschnitt der Pharm. Staatsprüfung:	April 1980 in München
Pharmazie-Praktikum:	Okt. 1980 bis März 1981 St.Georgs-Apotheke München
3.Prüfungsabschnitt der Pharm. Staatsprüfung:	Juli 1981 in München
Approbation als Apotheker:	27. Juli 1981
Wissenschaftliche Tätigkeit:	ab Mai 1980 am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München; seit April 1981 gleichzeitig beschäftigt als wissenschaftliche Hilfskraft; Promotionsarbeit unter der Leitung von Professor Dr. H. Wagner